Über die Komponenten des Elektronentransportsystems bei Hydrogenomonas H 16

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg - August - Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jürgen Ahrens
aus Wismar

Göttingen 1966

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0017

Über die Komponenten des Elektronentransportsystems bei Hydrogenomonas H 16

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg - August - Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Jürgen Ahrens
aus Wismar

Göttingen 1966

Diese Arbeit wurde im
Institut für Mikrobiologie
der Universität Göttingen
durchgeführt.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

D 7

Referent: Prof. Dr. H.G. Schlegel
Korreferent: Prof. Dr. A. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 7. 66

26. Juli 1966

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung 1

Experimente und Ergebnisse

I. Zusammensetzung und Lokalisation der Wasserstoffoxydierenden Systeme

1. Elektronenüberträger 4
2. Enzyme der Elektronentransportketten 12
3. Ferredoxin 17

II. Beziehungen zwischen den Geschwindigkeiten der Wasserstoffoxydation, dem Adenylatsystem und dem Redoxverhältnis der Pyridinnucleotide

1. Problemstellung 21
2. Das Adenylatsystem

a. Intrazelluläre ATP-Konzentration 23
b. Adenylatkinase 25

3. Gehalt an Pyridinnucleotiden und deren Redoxverhältnisse

a. Bestimmungsmethode 27
b. Gesamtkonzentrationen an NAD(H) und NADP(H) 31
c. Intrazelluläre Redoxverhältnisse des Nicotinamid-adenin-dinucleotids 32

III. Untersuchungen über die Hydrogenasen bei Hydrogenomonas H 16

1. Herstellung der zellfreien Extrakte 35
2. Methoden zur Bestimmung der löslichen Hydrogenase 36

Seite

3. Eigenschaften der löslichen Hydrogenase 37
4. Eigenschaften der partikelgebundenen Hydrogenase 44
5. Versuche zur Solubilisierung der partikelgebundenen Hydrogenase 45
6. Verteilung und Eigenschaften der Hydrogenasen bei Hydrogenomonas ruhlandii und Hydrogenomonas facilis 47

IV. Kinetik der NAD-Reduktion

1. Der zeitliche Verlauf der NAD-Reduktion 48
2. Untersuchungen über die Anlaufphase 49
3. Produkthemmung der löslichen Hydrogenase 55
4. Die regulative Funktion der löslichen Hydrogenase 61

Diskussion

A. Elektronentransport 65

B. Regulatorische Kontrollmechanismen 76

Methoden 80

Zusammenfassung 96

Literaturverzeichnis 98

EINLEITUNG

Organismen können nach Art der Kohlenstoffquelle, aus der sie ihre Zellbestandteile aufzubauen vermögen, und nach Art der Energiequelle, aus der sie die dazu erforderliche Energie beziehen, in verschiedene Stoffwechseltypen eingeteilt werden.
C-autotrophe Organismen sind in der Lage, alle organischen Substanzen, die in ihren Zellen vorhanden sind, aus dem Kohlendioxyd der Luft und anorganischen Stickstoff-, Schwefel- und Phosphorverbindungen aufzubauen. Als Energiequelle dient den Photoautotrophen die Strahlungsenergie des Sonnenlichts, den Chemolithoautotrophen die Energie, die durch Oxydation anorganischer Verbindungen gewonnen wird.
Alle übrigen Organismen sind heterotroph. Neben den unentbehrlichen Mineralstoffen benötigen sie vorgebildete organische Nährstoffe, die sie zum Teil in körpereigenes Material umwandeln, zum Teil zum Zwecke der Energiegewinnung verbrennen. Bei ihnen können also Kohlenstoff- und Energiequelle identisch sein. Der heterotrophe Stoffwechseltyp setzt die Existenz autotropher Organismen voraus.

Bei der Primärreaktion der Photosynthese in grünen Pflanzen und einigen zur Photosynthese befähigten Mikroorganismen wird unter Verwertung der absorbierten Strahlungsenergie durch die Photolyse des Wassers eine Potentialdifferenz mit der Trennung des Wasserstoffs vom Sauerstoff erzeugt. In ähnlicher Weise wird die Potentialdifferenz zwischen Wasserstoff und Sauerstoff, oder, mit anderen Worten, die mit der Wasserstoffoxydation verbundene Änderung der freien Energie durch alle nicht-photosynthetisierenden Organismen genutzt, um in einer kontrollierten, gesteuerten Knallgasreaktion über die Redox-Systeme der Atmungskette Energie in biochemisch verwertbarer Form zu gewinnen. Dabei werden beim heterotrophen Stoffwechseltyp die Wasserstoffatome durch Dehy-

drierung organischer Substrate und bei einigen chemolithoautotrophen Mikroorganismen die dem Wasserstoff entsprechenden Reduktionsäquivalente durch Oxydation niedriger Oxydationsstufen des Schwefels, Stickstoffs oder Eisens gewonnen.
Unter den chemolithoautotrophen Organismen nehmen die Knallgasbakterien eine Sonderstellung ein, weil sie einerseits mit Hilfe wasserstoffaktivierender Enzymsysteme durch direkte Oxydation des Wasserstoffs Energie gewinnen und durch Bindung des Wasserstoffs an Pyridinnucleotide Reduktionspotential für die Fixierung des Kohlendioxyds bereitstellen, andererseits aber auch mit verschiedenen organischen Substraten wachsen. Die Zugehörigkeit zu zwei Stoffwechseltypen machte die Knallgasbakterien für vergleichende physiologische und biochemische Untersuchungen besonders attraktiv, insbesondere nachdem Schwierigkeiten in der Anzucht größerer Mengen autotroph gewachsener Zellen durch die Entwicklung eines Submersverfahrens (SCHLEGEL, KALTWASSER u. GOTTSCHALK 1961) überwunden waren.
Die Untersuchungen wurden hauptsächlich mit dem von WILDE (1962) isolierten Hydrogenomonas H 16 durchgeführt. Die Assimilation des CO_2 erfolgt über den reduktiven Pentosephosphatcyclus (GOTTSCHALK 1963). Ruhende Zellen von Hydrogenomonas oxydieren Wasserstoff in Gegenwart von CO_2 viermal so schnell als ohne CO_2 (SCHLEGEL, GOTTSCHALK u. BARTHA 1961; BARTHA 1962). Dabei wird Kohlendioxyd in Substratmengen verbraucht und über Acetyl-CoA (SCHINDLER 1964) in den Speicherstoff Poly-ß-hydroxybuttersäure überführt, der bis zu 80 % des Zellmaterials ausmachen kann (GOTTSCHALK 1964). Fructose, die als einziger Zucker über den Entner-Doudoroff-Abbauweg verwertet wird (GOTTSCHALK, EBERHARDT u. SCHLEGEL 1964), und Wasserstoff wirken in Gegenwart verschiedener Kohlenstoffquellen als starke Repressoren einiger Enzymsysteme (GOTTSCHALK 1965). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Hydrogenase ein induzierbares Enzym ist (BARTHA 1962), dessen Aktivität sich in zellfreien Extrakten auf zwei Fraktionen ver-

teilt (EBERHARDT 1965).
Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Zusammensetzung und Lokalisation der Wasserstoff-oxydierenden Enzymsysteme bei Hydrogenomonas H 16, mit regulatorischen Fragen, die Beeinflussung der Knallgasreaktion durch Kohlendioxyd sowie mit Untersuchungen über Eigenschaften und Kinetik der löslichen Hydrogenase bei Hydrogenomonas H 16.

Experimente und Ergebnisse

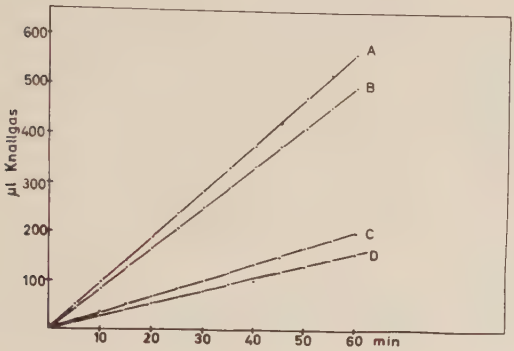
I. Zusammensetzung und Lokalisation der Wasserstoff-oxydierenden Systeme.

1. Elektronenüberträger.

Werden durch Ultraschallbehandlung hergestellte und durch 20 min. Zentrifugieren bei 8000 g von Zellwänden befreite Rohextrakte aus autotroph gewachsenen Zellen von Hydrogenomonas H 16 eine Stunde bei 100 000 g zentrifugiert, erhält man eine klare, braungefärbte überstehende Fraktion und ein rotbraunes, gelatinöses Sediment. Der Überstand wird im folgenden als "lösliche Fraktion", das gewaschene und in Phosphatpuffer resuspendierte Sediment als "Partikelfraktion" bezeichnet.

Sowohl die lösliche Fraktion als auch die Partikelfraktion von Hydrogenomonas H 16 und zum Vergleich herangezogener Hydrogenomonas ruhlandii sind in der Lage, die für Hydrogenomonas-Arten charakteristische Knallgasreaktion zu katalysieren (Abb. 1). Beide Fraktionen müssen also über funktionsfähige Elektronentransportketten verfügen, die eine Oxydation des Wasserstoffs mit Sauerstoff ermöglichen. Das von einer Suspension autotroph gewachsener Zellen von Hydrogenomonas H 16 aufgenommene Differenzspektrum (Abb. 2) läßt durch das breite Absorptionsminimum bei 460 mμ und die Absorptionsmaxima bei 550 und 560 mμ auf die Anwesenheit von Flavinen und Cytochromen des c- und b-Typs schließen. Während das Differenzspektrum der löslichen Fraktion (Abb. 3) neben Flavin nur Cytochrom c aufweist, finden sich in dem von gewaschenen Partikeln aufgenommenen Differenzspektrum (Abb. 4) neben Flavin die für Cytochrom c und Cytochrom b charakteristischen Absorptionen. Dem Auftreten von Cytochrom c in der löslichen Fraktion braucht keine physiolo-

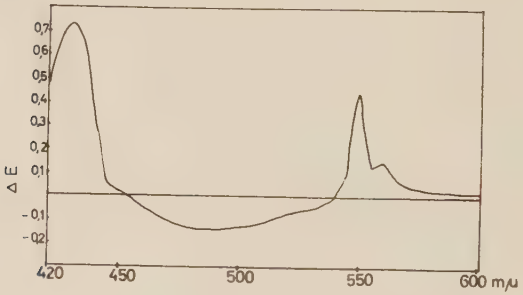
Abb. 1 Durch lösliche und partikuläre Fraktionen aus Hydrogenomonas H 16 und Hydrogenomonas ruhlandii katalysierte Wasserstoffoxydation.



Hauptraum:	Phosphatpuffer (pH 7,5)	120 µmole
	Extrakt	(wie angegeben)
Zentralgefäß:	0,2 ml KOH	(20 %ig)
Gesamtvolumen:	2,2 ml	
Gasgemisch:	75 % H_2,	25 % Luft

A: Partikelfraktion aus H. ruhlandii (3,21 mg Protein)
B: Partikelfraktion aus Hydrogenomonas H 16 (3,18 mg Protein)
C: Lösliche Fraktion aus H. ruhlandii (3,41 mg Protein)

Abb. 2 Differenzspektrum autotroph gewachsener Zellen von Hydrogenomonas H 16

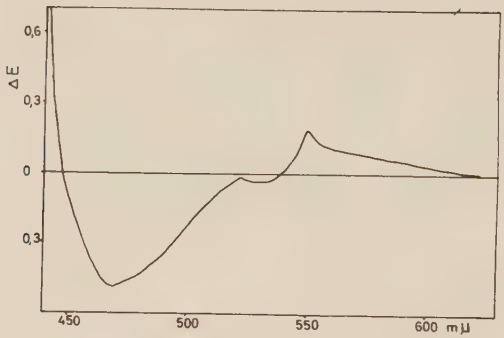


Zwei 1 cm-Küvetten wurden mit je 2,5 ml einer gewaschenen und in 0,06 M Phosphat (pH 7) aufgenommenen Zellsuspension (0,07 mg Trockengew./ml) gefüllt, die Zellen der Testküvette durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit im reduzierten, die Zellen der Vergleichsküvette durch wiederholtes Schütteln an der Luft während der Messung im oxydierten Zustand gehalten.

gische Bedeutung zuzukommen, da Cytochrom c im Gegensatz zu Cytochrom b leicht von Partikeln abgelöst wird (DEEP u. HAGER 1964). Dagegen sind nach den Spektren Flavoproteine in beiden Fraktionen vorhanden. Eine quantitative Bestimmung der Flavine in autotroph gewachsenen Zellen nach der von PEEL (1958) angegebenen Methode durch Säulenchromatographie eines Trichloressigsäureextraktes an Florisil ergab einen Gesamtflavingehalt von 153 mμmole/g Trockengew., der sich nach elektrophoretischer Trennung zu etwa gleichen Teilen aus FAD und FMN zusammensetzt.

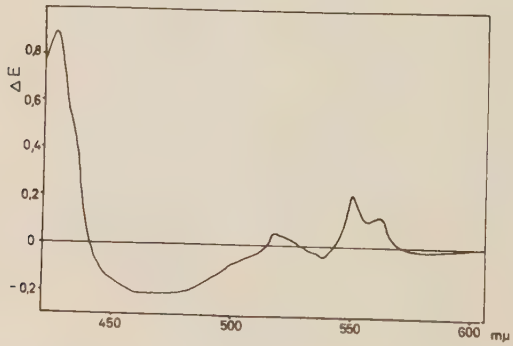
In Zellen höherer Organismen sind die Atmungsketten zusammen mit den Enzymen des Tricarbonsäurecyclus, der Fettsäureoxydation und dem für die oxydative Phosphorylierung verantwortlichen Enzymsystem in den Membranstrukturen der Mitochondrien lokalisiert. Oxydative Phosphorylierungen erfolgen in den in ähnlicher Weise erhaltenen Partikelfraktionen (BRODIE u. ADELSON 1965). Da die Knallgasreaktion mit den Partikeln vier bis acht mal schneller abläuft als mit der löslichen Fraktion und wegen der aus den Differenzspektren ersichtlichen Verteilung der Elektronentransportkomponenten, war anzunehmen, daß in den Partikeln eine vollständige, mit der oxydativen Phosphorylierung verknüpfte Atmungskette vorliegt, während in der löslichen Fraktion eine verkürzte, nicht-phosphorylierende Elektronentransportkette die Oxydation des Wasserstoffs mit Sauerstoff ermöglicht.

Abb. 3 Differenzspektrum der löslichen Fraktion aus Hydrogenomonas H 16.



Proteinkonzentration: 3,4 mg/ml
Durchführung wie bei Abb. 2.

Abb. 4 Diffenrenzspektrum der Partikelfraktion aus Hydrogenomonas H 16.



Proteinkonzentration: 1,58 mg/ml
Durchführung wie bei Abb. 2.

Hinweise auf Unterschiede in der Zusammensetzung der die Knallgasreaktion katalysierenden Transportsysteme der löslichen und partikulären Fraktion ergaben sich zunächst aus der Wirkung verschiedener Hemmstoffe (Tab. 1).

Tab. 1. Hemmung der durch die lösliche und partikuläre Fraktion katalysierten Wasserstoffoxydation mit verschiedenen Inhibitoren.

	Atebrin		KCN		NaN_3
	1.10^{-3}M	1.10^{-2}M	5.10^{-4}M	1.10^{-3}M	5.10^{-4}M
Lösliche Fraktion	38	53	0	0	5
Partikelfraktion	34	47	40	90	54

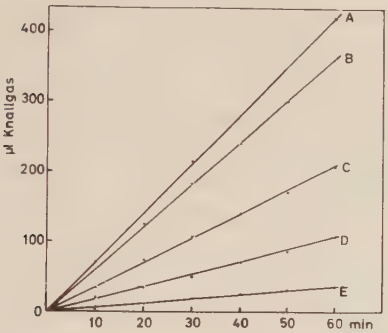
Angaben in % der unvergifteten Kontrolle.

Während der Flavin-Antagonist Atebrin die Knallgasreaktion in beiden Fraktionen etwa im gleichen Maße hemmt, richtet sich die Wirkung der als Inhibitoren der Cytochromoxydase bekannten Cyanide und Azide fast ausschließlich gegen die Partikelfraktion.
Kurzwelliges Licht zerstört natürlich vorkommende Benzo- und Naphthochinone, ohne die am Elektronentransport und an der oxydativen Phosphorylierung beteiligten Enzyme zu schädigen. So verlieren Extrakte aus Mycobacterium phlei durch Bestrahlung mit UV-Licht die Fähigkeit, Malat zu veratmen und eine oxydative Phosphorylierung durchzuführen. Durch Zusatz von Menadion konnten beide Funktionen wiederhergestellt werden (BRODIE 1961). Um zu prüfen, ob am Elektronentransport der Wasserstoffoxydierenden Systeme bei Hydrogenomonas H 16 natürliche Chinone beteiligt sind, wurden kleine Mengen der Partikelfraktion und der löslichen Fraktion bestimmte Zeiten mit UV-Licht bestrahlt. Dabei werden beide Fraktionen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer stark geschädigt. Zusätze von Menadion (2 µmole) erhöhen die Geschwindigkeit

der Knallgasreaktion jedoch sowohl in bestrahlten als auch in nichtbestrahlten Präparaten (Abb. 5) .

Die Erklärung für dieses Verhalten erbrachte der Nachweis einer relativ hohen Menadionreductase-Aktivität (Tab.2). Durch die Autoxydabilität des reduzierten Menadions eröffnet sich ein Nebenweg, der zu einem der Konzentration des eingesetzten Menadions entsprechenden Anstieg der Knallgasreaktion führt.

Abb. 5 Schädigung der durch die lösliche Fraktion von Hydrogenomonas H 16 katalysierten Wasserstoffoxydation durch Bestrahlen mit UV-Licht und Erhöhung der Reaktion durch Menadion.



Hauptraum: Phosphatpuffer (pH 7,5) 120 µmole
Lösliche Fraktion 2,18 mg Protein(wie angegeben)

Seitenarm: Menadion (wie angegeben)

Zentralgefäß: 0,2 ml KOH (20 %ig)

Gesamtvolumen: 2,2 ml

Gasgemisch: 75 % H_2, 25 % Luft

A: unbestrahlte lösliche Fraktion und 2 µmole Menadion.

B: 3 Std. mit UV-Licht bestrahlte lösliche Fraktion und 2 µmole Menadion

C: 3 Std. mit UV-Licht bestrahlte lösliche Fraktion und 1 µmol Menadion

D: unbestrahlte lösliche Fraktion, ohne Menadion

E: 3 Std. mit UV-Licht bestrahlte lösliche Fraktion, ohne Menadion.

2. Enzyme der Elektronentransportketten

Aus Tab. 2, die eine Übersicht über Verteilung und Aktivitäten der mit dem Elektronentransport verbundenen Enzyme gibt, ist ersichtlich, daß nur die in der löslichen Fraktion auftretende Hydrogenase fähig ist, NAD zu reduzieren. Die Aktivität der partikelgebundenen Hydrogenase wurde durch die H_2-Aufnahme mit Methylenblau als Akzeptor gemessen. Wegen der hohen Aktivität beider Enzyme können die durch sie katalysierten Reaktionsschritte nicht begrenzend auf die Geschwindigkeiten der Knallgasreaktion wirken.

Neben der relativ hohen Aktivität an Menadionreductase, die auch in Hydrogenomonas eutropha nachgewiesen wurde (REPASKE u. LIZOTTE 1963 u. 1965), und der bei der oxydativen Decarboxylierung der Brenztraubensäure eine Rolle spielenden Diaphorase ist auffallend, daß in allen Fällen, in denen $NADH_2$ als Substrat fungiert, auch geringe Aktivitäten in der Partikelfraktion spektroskopisch nachzuweisen waren.

Die anfangs erhobene Arbeitshypothese, daß die Wasserstoff-Oxydation in der den Mitochondrien höherer Zellen in mancher Hinsicht vergleichbaren Partikelfraktion durch eine vollständige, mit der oxydativen Phosphorylierung gekoppelten Atmungskette, in der löslichen Fraktion jedoch durch eine verkürzte, nicht-phosphorylierende Elektronentransportkette katalysiert wird, wird weiter durch den Befund erhärtet, daß eine Cytochrom-Oxydase nur in den Partikeln und nicht in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden konnte.

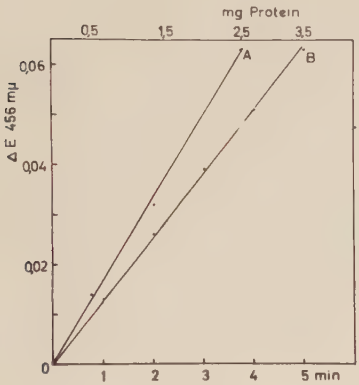
Tab. 2 Verteilung und Aktivitäten der Enzyme des Elektronentransports in zellfreien Extrakten autotroph gewachsener Zellen von Hydrogenomonas H 16

Nr. der Enzym-Com.	Trivialname	Offizieller Name	Substrat u. Akzeptor	Spez. Aktivitäten (mE/mg Protein) Lösl.Frakt.	Part.Fr.
1.98.1.1.	Lösl.Hydrogenase		H_2 u. NAD	156	0
1.98.1.1.	Part.Hydrogenase		H_2 u. Methylenblau	0	600
---	$NADH_2$-Oxydase		$NADH_2$ u. O_2	11	8
---	$NADPH_2$-Oxydase		$NADPH_2$ u. O_2	3	1
1.6.4.3.	Diaphorase	$NADH_2$: Lipoamid-Oxidoreductase	$NADH_2$ u. Methylenblau	41	10
1.6.2.1.	Cytochrom c-Reductase	$NADH_2$: Cytochrom c-Oxido-reductase	$NADH_2$ u. Cytochrom c	18	6
1.3.99.1.	Succinat-Dehydrogenase	Succinat: (Akzeptor)-Oxido-reductase	Succinat u. Methylenblau	2	2
1.6.5.2.	Menadion-Reductase	$NADH_2$: 2-Methyl-1,4-naphtho-chinon-Oxidoreductase	$NADH_2$ u. Menadion	351	70
1.9.3.1.	Cytochrom-Oxydase	Cytochrom c: O_2-Oxidoreduc-tase	Cytochrom c u. O_2	0	89*

*) mE Indophenolblau/mg Protein

Zur Bestimmung dieses Enzyms diente die sogenannte Nadi-Reaktion in der Modifizierung, wie sie früher zur quantitativen Aktivitätsbestimmung in Rattenlebermitochondrien angewandt worden ist (STRAUS 1954). Die Methode beruht auf der in Anwesenheit von Cytochrom c erfolgenden Bildung von Indophenolblau aus α-Naphthol und Dimethyl-p-phenylendiamin. Die Angabe der Aktivität in Indophenolblau-Einheiten eignet sich nicht zu Vergleichen mit den Aktivitäten anderer Enzyme, wohl aber zu Vergleichen der Cytochromoxydase-Aktivität anderer Organismen oder unter verschiedenen Bedingungen gewachsener Zellen. Eine Indophenolblau-Einheit ist definiert als die in 10 ml Chloroform gelöste Menge an Indophenolblau, die bei der Oxydation von 0,1 mg α-Naphthol und der äquimolaren Menge Dimethyl-p-phenylendiamin mit Kaliumdichromat entsteht. Unter den angewandten Bedingungen verlief die Bildung von Indophenolblau mit der Inkubationszeit und der eingesetzten Proteinmenge linear (Abb. 6). Tabelle 3 zeigt die Verteilung und die Aktivitäten der Cytochrom-Oxydase bei autotroph und heterotroph auf Fructose gewachsenen Zellen von Hydrogenomonas H 16 sowie von aerob gewachsenen Zellen von E. coli, aus deren zellfreiem Extrakt sich durch fraktionierte Zentrifugation in gleicher Weise eine geringe Menge an Partikeln abtrennen ließ.

Abb. 6 Lineare Beziehungen zwischen der durch die Partikelfraktion katalysierten Bildung von Indophenolblau und der Inkubationszeit bzw. der Proteinmenge.



A: Bildung von Indophenolblau in Abhängigkeit von der Partikelmenge bei konstanter Inkubationszeit und -temperatur (5 Minuten, 37°).

B: Bildung von Indophenolblau in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei konstanter Partikelmenge und Inkubationstemperatur (2,5 mg Protein, 37°).

Tab. 3. Verteilung und Aktivitäten der Cytochrom-Oxydase

Organismus	Spez.Aktivität (mE Indophenolblau) Partikelfraktion	Lösliche Fraktion
H 16, autotroph	89	(11,4) +)
H 16, heterotroph (Fructose)	60,1	(2,5) +)
E.coli, aerob	20,7	0

+) Nach einer 2. einstündigen Zentrifugation bei 100 000 g waren in den löslichen Fraktionen keine Cytochromoxydase-Aktivität mehr nachweisbar.

Außer mit Wasserstoff konnte in den Partikeln nur ein Elektronentransport mit Succinat als Substrat nachgewiesen werden. Neben Acetat, Lactat und ß-Hydroxybutyrat wurden auch Malat und α-Glycerophosphat, denen in höheren Zellen eine besondere Rolle beim Transport von Wasserstoff zwischen extra- und intramitochondrialem NADH zugeschrieben wird, von den Partikeln weder direkt noch nach Zugabe von Methylenblau oxydiert. ß-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, in Zellen höherer Organismen ein typisch mitochondriales und sehr schwer extrahierbares Enzym (WISE u. LEHNINGER 1962), findet sich bei Hydrogenomonas H 16 mit einer spezifischen Aktivität von 96 mE nur in der löslichen Fraktion.

3. Ferredoxin

Untersuchungen über den Mechanismus der Wasserstoff-Entwicklung in zellfreien Extrakten von Clostridium pasteurianun führten zur Isolierung eines neuen Pyruvat-Dehydrogenase und Hydrogenase verbindenden Elektronenüberträgers, der wegen seines Eisengehaltes (Ferrum), seines ungewöhnlich niedrigen Redoxpotentials und seiner Protein-Natur Ferredoxin benannt wurde (MORTENSEN, VALENTINE u. CARHAHAN 1962; MORTENSEN, VALENTINE, JACKSON u. WOLFE 1962). In der Folge wurde Ferredoxin kristallisiert erhalten, in vielen anaeroben und photosynthetisierenden Mikroorganismen nachgewiesen (VALENTINE u. WOLFE 1963; BUCHANAN, LOVENBERG u. RABINOWITZ 1963) und auch aus Spinatchloroplasten isoliert, in denen es eine wichtige Rolle bei den Energieumwandlungsprozessen der Photosynthese spielt (TAGAWA, TSUJIMOTO u. ARNON 1963).

Da Ferredoxin mit -0,432 V bei pH 7,11 das niedrigste Redoxpotential aller bekannten, natürlich vorkommenden Elektronenüberträger besitzt und dieses dem Potential der Wasserstoffelektrode (-0,42 V bei pH 7) entspricht, lag die Annahme nahe, daß Ferredoxin in allen Bakterien vorkommt, die vermittels Hydrogenasen in der Lage sind, gasförmigen Wasserstoff zu entwickeln oder zu verbrauchen.

Um zu prüfen, ob Hydrogenomonas einen derartigen Elektronenüberträger besitzt, wurde Ferredoxin zunächst aus Cl.pasteurianum angereichert. Ferredoxin wird auf Grund seiner sauren Eigenschaften bei der Chromatographie an DEAE-Zellulose am Säulenkopf als dunkelbraune Zone adsorbiert und läßt sich erst mit einer Lösung hoher Ionenstärke eluieren. Ein aus Zellen von Cl.pasteurianum (100 g Naßgew.) durch Aufschluß mit der Hughes-Presse erhaltener Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie in eine proteinreiche, das phosphoroklastische Enzymsystem enthaltende Fraktion A

und in eine proteinärmere, rötlichbraun gefärbte, Ferredoxin-haltige Fraktion B aufgetrennt. Im Gegensatz zum Rohextrakt sind die Fraktionen A und B einzeln nicht mehr in der Lage, die in Gegenwart von Coenzym A erfolgende phosphoroklastische Reaktion

$$BTS + H_3PO_4 \longrightarrow \text{Acetylphosphat} + CO_2 + H_2$$

zu katalysieren. Die Reaktion läuft erst ab, wenn man dem Fraktion A enthaltenden Ansatz Ferredoxin der Fraktion B oder Methylviologen zusetzt. Eine Ferredoxin-Einheit gibt die Menge Ferredoxin an, die unter definierten Bedingungen in Gegenwart eines Überschusses des aus Pyruvat-Dehydrogenase, Hydrogenase und Transacetylase bestehenden phosphoroklastischen Systems die Bildung von 1 µmol Acetylphosphat katalysiert. Durch die Chromatographie an DEAE-Zellulose wurde eine mehr als 20-fache Anreicherung erreicht (Tab. 4) .

Tabelle 4. Reinigung von Ferredoxin aus Clostridium pasteurianum

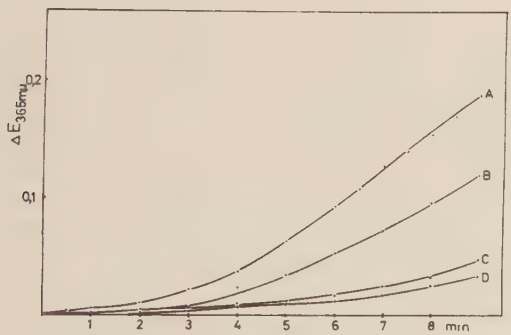
Fraktion	Volumen (ml)	Protein-gehalt (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	Spez.Aktivität (Ferredoxin-Einheiten/15 min.)	Gesamtaktivität
Rohextrakt	40	20,5	820	1,98	1603
Fraktion B (Dialysat)	18	1,44	26	42	865
Fraktion A	21	20,1	422	--	--

Bei der unter gleichen Bedingungen durchgeführten Chromatographie eines Rohextraktes aus autotroph gewachsenen Zellen von Hydrogenomonas H 16 wurde in analoger Weise eine proteinreiche Fraktion A erhalten. Es bildete sich jedoch keine auf die Anwesenheit von Ferredoxin hindeutende dunkelbraune Zone aus. Es ließ sich lediglich eine schwach gelb gefärbte, flavinhaltige Fraktion B eluieren.

Die durch Fraktion A katalysierte Reduktion von NAD mit Wasserstoff wurde weder von der Fraktion B aus H 16 noch von der Ferredoxin enthaltenden Fraktion B aus Cl.pasteurianum stimuliert. Andererseits konnte auch Fraktion B aus H 16 Fraktion B aus Cl.pasteurianum bei der Pyruvatspaltung nicht ersetzen. Zusätze von Benzylviologen, das wie Methylviologen als künstlicher Redoxkatalysator eine ähnliche Wirkung wie Ferredoxin besitzt, verursachten sogar eine scheinbare Hemmung der durch die lösliche Hydrogenase von H 16 katalysierten NAD-Reduktion (Abb. 7), da das gebildete $NADH_2$ mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor durch die lösliche und die Partikelfraktion von H 16 enzymatisch reoxydiert wird (Abb. 8).

Trotz seines Wasserstoff-aktivierenden Enzymsystems war also bei Hydrogenomonas H 16 kein Ferredoxin nachzuweisen.

Abb. 7 Einfluß von Benzylviologen auf die NAD-Reduktion



Die Messungen erfolgten in einer evakuierten und mit Wasser-

stoff gespülten Thunbergküvette.

Hauptraum: Tris-HCl (pH 7,8) 200 µmole
Lösliche Fraktion 1,18 mg Protein
Benzylviologen (wie angegeben)

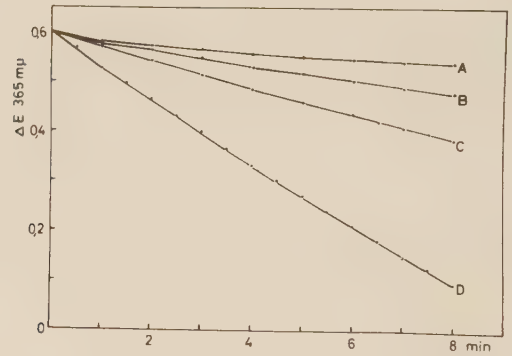
Seitenarm: NAD 0,6 µmole

Volumen: 3 ml; Atmosphäre: Wasserstoff

A: ohne Benzylviologen B: 0,25 µmole Benzylviologen

C: 0,5 µmole Benzylviologen D: 1 µmol Benzylviologen

Abb. 8 Zeitlicher Verlauf der durch die lösliche und partikuläre Fraktion katalysierten NADH-Oxydation und deren Stimulierung durch Benzylviologen.



Thunbergküvette

Hauptraum: Tris-HCl (pH 7,8) 200 µmole
Extrakt (wie angegeben)
Benzylviologen (wie angegeben)

Seitenarm: NADH (0,6 µmole)

Volumen: 3 ml; Atmosphäre: Luft

A: Lösliche Fraktion (1,18 mg Protein)

B: Partikelfraktion (3,56 mg Protein)

C: Partikelfraktion (1,78 mg Protein), 1 µmol Benzylviologen

D: Lösliche Fraktion (1,18 mg Protein), 1 µmol Benzylviologen

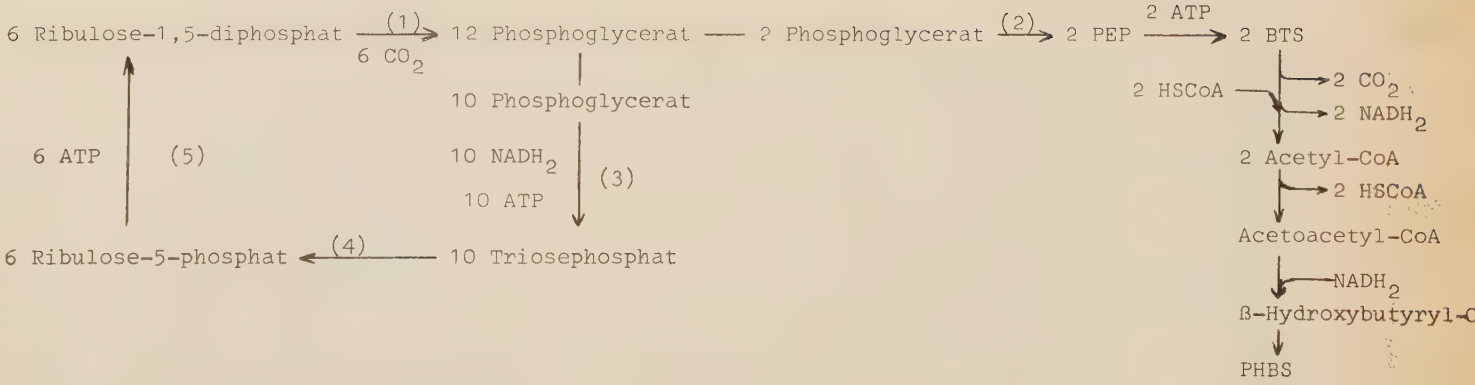
II. Beziehungen zwischen den Geschwindigkeiten der Wasserstoffoxydation, dem Adenylat-System und dem Redoxverhältnis der Pyridinnucleotide.

1. Problemstellung

Wie bereits erwähnt, erhöht sich die Geschwindigkeit der Wasserstoffoxydation ganzer Zellen von Hydrogenomonas H 16 in Gegenwart von Kohlendioxyd um das drei- bis vierfache gegenüber der Leerlaufreaktion in Abwesenheit von Kohlendioxyd. Während die Zellen unter Wachstumsbedingungen Protein bilden, wird unter Ruhebedingungen, in Abwesenheit einer Stickstoffquelle, PHBS als Speicherstoff synthetisiert (SCHLEGEL, GOTTSCHALK u. BARTHA 1961). Die Rate der Gasaufnahme ist unter Wachstumsbedingungen etwas höher als unter Speicherbedingungen.

Die Fixierung des Kohlendioxyd erfolgt unter autotrophen Bedingungen hauptsächlich über den Calvincyclus. Die in Abb. 9 skizzierte Reaktionsfolge, die bis zur Bildung des ß-Hydroxybutyryl-CoA durchlaufen wird, setzt sich aus den Teilreaktionen 1 - 5 zusammen.
Von dem durch die Carboxydismutase-Reaktion (1) gelieferten Phosphoglycerat wird nur 1/6 in ß-Hydroxybutyryl-CoA überführt (2). 5/6 des Phosphoglycerats müssen zu Triosephosphat reduziert werden (3), um über Ribulose-5-phosphat (4) den Akzeptor der CO_2-Fixierung Ribulose-1,5-diphosphat zu regenerieren (5). Während bei der zum Speicherstoff PHBS führenden Reaktionsfolge eine geringe Menge an ATP und $NADH_2$ entsteht (2), benötigen die Regenerierungsreaktionen (3) und (5) eine große Menge an Energie in Form von ATP und die Reaktion (3) eine große Menge an Reduktionspotential in Form von $NADH_2$. Von den 6 Molekülen CO_2, die zur Bildung von einem Molekül ß-Hydroxybutyryl-CoA fixiert werden, gehen 2 Moleküle bei der oxydativen Decarboxylierung der beiden Brenz-

Abb. 9 Schema der zum Speicherprodukt PHBS führenden CO_2-Fixierung



1. 6 Ribulose-1,5-diphosphat + 6 CO_2 ⟶ 12 Phosphoglycerat
2. 2 Phosphoglycerat + 2 ADP + NAD $\xrightarrow{(HSCoA)}$ ß-Hydroxybutyryl-CoA + 2 ATP + $NADH_2$ + 2 CO_2
3. 10 Phosphoglycerat + 10 $NADH_2$ + 10 ATP ⟶ 10 Triosephosphat + 10 ADP + 10 NAD + 10 P_a
4. 10 Triosephosphat ⟶ 6 Ribulose-5-phosphat + 4 P_a
5. 6 Ribulose-5-phosphat + 6 ATP ⟶ 6 Ribulose-1,5-diphosphat + 6 ADP

---

6. 4 CO_2 + 14 ATP + 9 $NADH_2$ $\xrightarrow{(HSCoA)}$ ß-Hydroxybutyryl-CoA + 14 ADP + 9 NAD + 10 P_a

traubensäuremoleküle wieder verloren. Damit ergibt sich als Summe der Reaktionen 1-5 in Gleichung 6 als Bilanz, daß zur Fixierung von 4 Molekülen CO_2 14 Moleküle ATP und 9 Moleküle $NADH_2$ erforderlich sind.
Das bei der CO_2-Fixierung verbrauchte ATP muß durch die Atmungskettenphosphorylierung, das verbrauchte $NADH_2$ durch die mit NAD verbundene Hydrogenase-Reaktion nachgeliefert werden. Wenn Rückkopplungseffekte zwischen dem Adenylat-System und der oxydativen Phosphorylierung einerseits und zwischen dem Redoxverhältnis der Pyridinnucleotide und der Hydrogenase-Reaktion andererseits bestehen würden, könnte die Geschwindigkeit der mit der oxydativen Phosphorylierung verbundenen Knallgasreaktion durch die zur Verfügung stehende Menge an ADP, die Geschwindigkeit der Hydrogenase-Reaktion durch die verfügbare Konzentration an NAD bestimmt werden. Um die Beziehungen zwischen den Geschwindigkeiten der Wasserstoffoxydation und den intrazellulären Konzentrationen der Coenzyme des Adenylatsystems und der Pyridinnucleotide zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, diese Coenzyme in Extrakten von Zellen, die unter Speicher- und Leerlaufbedingungen inkubiert waren, quantitativ zu bestimmen. Dafür waren Methoden erforderlich, die eine quantitative Erfassung der aus relativ dünnen Bakteriensuspensionen (bis 0,5 mg Trockengew./ml) extrahierten Coenzyme erlaubten.

2. Das Adenylat-System

a. Intrazelluläre ATP-Konzentrationen: Das empfindlichste Verfahren zur Bestimmung von ATP ist die Biolumineszenzmethode (STREHLER u. McELROY 1957), die auf der Messung des in Gegenwart des Luciferin-Luciferase-Systems emittierten Lichts beruht. Die der ATP-Konzentration proportionale Lichtausstrahlung kann mit Hilfe eines Fluorimeters oder eines Quantenzählers bestimmt werden. Unter Verwendung des Lu-

ciferin-Luciferase-System aus getrockneten Leuchtorganen und eines auf -10^{o} gekühlten, mit dem Strahlungsmeßgerät FH 90 verbundenen Szintillationszählers FHT 660 C war in einem Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^{-7}$ bis $1 \cdot 10^{-9}$ M ATP die Zahl der gezählten Lichtquanten der ATP-Konzentration proportional.

Mit dieser Methode wurden in mehreren Versuchen die ATP-Konzentrationen der Perchlorsäure-Extrakte aus autotroph gewachsenen, in Phosphatpuffer gewaschenen und resuspendierten und unter Knallgas in An- und Abwesenheit von Kohlendioxyd inkubierten Zellen von Hydrogenomonas H 16 bestimmt. Dabei wurde unter Leerlaufbedingungen ein durchschnittlicher Wert von 0,7 mg ATP/g Trockengewicht ermittelt. In allen Fällen war der ATP-Gehalt in den unter Speicherbedingungen inkubierten Zellen deutlich- im Durchschnitt um 30% - niedriger. Tab. 5 enthält die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches.

Tabelle 5. Bestimmung der ATP-Konzentration in Perchlorat-extrakten

Probe bzw. Vergleichslösung	Inkubationsbedingungen der Probe	emittiertes Licht (Imp./min.)+	ATP-Konzentrationen im Ansatz $x\ 10^{-7}$ M	$\mu g\ x10^{-3}$	$\mu g/mg$ Tr. Gew.++
$2 \cdot 10^{-7}$	-	1374	2	24	-
$1 \cdot 10^{-7}$	-	690	1	12	-
$7{,}5 \cdot 10^{-8}$	-	518	0,75	9	-
$5 \cdot 10^{-8}$	-	341	0,5	6	-
Extrakt a	H_2, O_2, CO_2	628	0,91	10,96	0,50
Extrakt b	H_2, O_2, CO_2	607	0,88	10,62	0,48
Extrakt c	H_2, O_2	890	1,30	15,61	0,71
Extrakt d	H_2, O_2	883	1,28	15,36	0,69

\+ Durchschnittswerte aus 5 Messungen

++ Dichte der Zellsuspension: 0,22 mg/ml

Unter Berücksichtigung eines Faktors von 10 für das Ver-

hältnis von Zellvolumen zu Trockengewicht (IMSANDE u. PRESTIDGE 1964) läßt sich eine intrazelluläre ATP-Konzentration von $1{,}44 \cdot 10^{-4}$ M unter den Bedingungen der Leerlaufreaktion gegenüber $1{,}08 \cdot 10^{-4}$ M unter Speicherbedingungen berechnen.

b. Adenylatkinase: Während die intrazellulären Konzentrationen von ATP und ADP sich bei den energieverbrauchenden Prozessen der Speicherstoffbildung und den energieliefernden Reaktionen der Wasserstoffoxydation in dem Sinne ergänzen, daß eine Abnahme an ATP mit einer Zunahme an ADP einhergeht und umgekehrt, treten unter Wachstumsbedingungen bei der Proteinsynthese energieverbrauchende Reaktionen auf, die das ATP zu AMP und Pyrophosphat spalten. Dieses AMP kann durch die Adenylatkinase-Reaktion

$$\text{AMP} + \text{ATP} \rightleftharpoons 2\ \text{ADP}$$

wieder in ADP, den Akzeptor der oxydativen Phosphorylierung, überführt werden. Da im Gleichgewicht die drei Phosphate in annähernd gleicher Konzentration vorliegen, ist die auch im Zusammenhang mit der regulatorischen Effektor-Wirkung bei einigen Enzymen wichtige intrazelluläre AMP-Konzentration von der Myokinase-Aktivität der Zellen abhängig. Aus Tab. 6, die die in zellfreien Extrakten gemessenen Myokinase-Aktivitäten wiedergibt, geht hervor, daß Hydrogenomonas H 16 relativ hohe Aktivitäten besitzt, die für einen schnellen Ausgleich der Adenylat-Konzentrationen sorgen.

Tabelle 6. Aktivitäten der Adenylatkinase nach verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Organismus	Wachstumsbedingungen	Adenylatkinase-Aktivität (mE/mg Protein)
Hydrogenomonas H 16	autotroph	3759
Hydrogenomonas H 16	heterotroph: Fructose	5893
Hydrogenomonas H 16	heterotroph: Acetat	6853
E. coli	heterotroph: Glucose	1385

Wie erwähnt, nimmt Hydrogenomonas H 16 unter Wachstumsbedingungen etwas mehr Gas auf als unter Speicherbedingungen. Auch diese Beobachtung wird unter der Annahme verständlich, daß die endogene Menge an ADP die Geschwindigkeit der Knallgasreaktion kontrolliert.
Dieser Befund wurde dadurch erklärt, daß im Falle der PHBS-Synthese aus Acetyl-CoA bei der oxydativen Decarboxylierung der Brenztraubensäure $NADH_2$ entsteht, das als zusätzliches Substrat der Atmungskette in gekoppelter Reaktion ATP aus ADP bildet (GOTTSCHALK 1963).

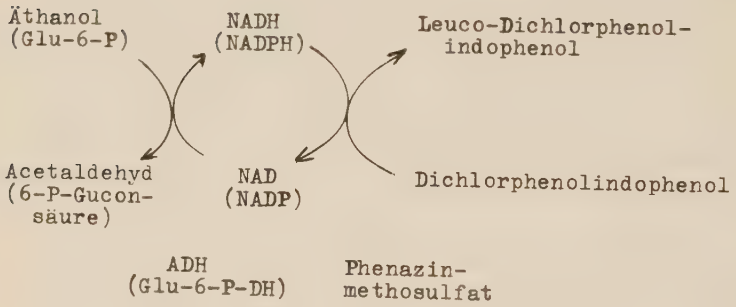
Eine weitere Erklärung liefert die Betrachtung der Wachstumsprozesse. Bei den energieverbrauchenden Reaktionen der Proteinbiosynthese entsteht AMP, das durch die Adenylatkinase-Reaktion mit ATP zu ADP phosphoryliert wird. Dabei wird im Vergleich zu energieverbrauchenden Reaktionen, bei denen ATP in ADP übergeht, die doppelte Menge an ADP gebildet. Sofern eine feste Kopplung zwischen dem Elektronentransport der Atmungskette und der Phosphorylierung besteht, muß jede ADP-verbrauchende Reaktion zu einer Verlangsamung und jede ATP-verbrauchende Reaktion zu einer Beschleunigung der Knallgasreaktion führen.

3. Gehalt an Pyridinnucleotiden und deren Redoxverhältnisse

a. Bestimmungsmethode: Trotz der bedeutenden Rolle, die die Pyridinnucleotide als Coenzyme im Stoffwechsel einnehmen, finden sich in der Literatur wegen des Fehlens einer genügend empfindlichen Bestimmungsmethode nur wenige Angaben über Gehalt der Pyridinnucleotide und deren Redoxverhältnisse in Mikroorganismen. Oxydierte Pyridinnucleotide zerfallen in alkalischer, reduzierte in saurer Lösung. Auf diesen Eigenschaften beruht ihre Trennung.

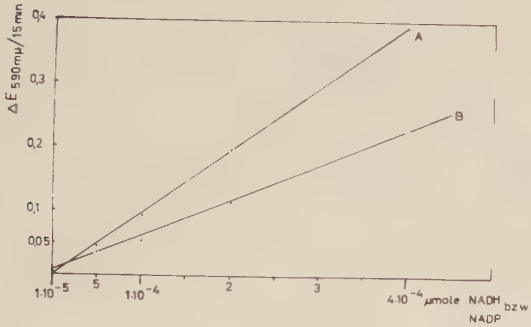
Bei der unter Versuchsbedingungen durchzuführenden Extraktion von Bakteriensuspensionen einer Dichte von 0,2 - 0,6 mg Tr.Gew./ml war nach Neutralisation der Proben ein Gehalt an NAD und NADH in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-5} µmole/ml zu erwarten (TAKEBE u. KITAHARA 1963). Eine quantitative Erfassung dieses Konzentrationsbereichs gelang nach Modifizierung einer von SLATER u. SAWYER (1962) bei der Bestimmung kleiner Mengen von Pyridinnucleotiden in Rattenleber angewandten Methode. Hierbei ermöglichen die in oxydierter Form vorliegenden Pyridinnucleotide im Falle von NAD die Oxydation von Äthanol mit Alkohol-Dehydrogenase oder im Falle von NADP die Oxydation von Glucose-6-phosphat mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase als Hilfsenzymen. Die bei diesen Reaktionen reduzierten Pyridinnucleotide werden in einer nichtenzymatischen Reaktion mit Phenazinmethosulfat reoxydiert, wobei der Wasserstoff auf 2,6-Dichlorphenolindophenol als Endakzeptor übertragen wird (Abb. 10).

Abb. 10. Schema der zur Bestimmung von Pyridinnucleotiden angewandten Methode.



Die Geschwindigkeit der Reduktion des 2,6-Dichlorphenolindophenol war den im Ansatz befindlichen Konzentrationen an NAD + NADH bzw. NADP + NADPH proportional (Abb. 11). Wegen der besonders in hoher Verdünnung auftretenden Instabilität dieser Coenzyme- die Meßausbeute einer $6 \cdot 10^{-13}$M NAD-Lösung sank nach viertägigem Aufbewahren bei 4° um 50 %- wurden die Konzentrationen der Proben durch Vergleich gegen gleichzeitig mit der Extraktion angesetzte Verdünnungsreihen ermittelt. Die Bestimmung von NAD und NADH aus Gemischen beider zeigt, daß durch die angewandten Extraktionsbedingungen selbst keine Verluste eintreten. Die Summen aus NAD und NADH waren annähernd konstant (Abb. 12).

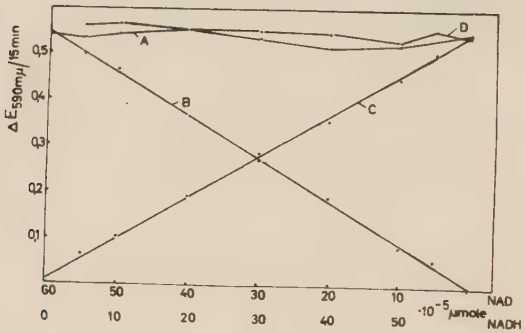
Abb. 11 Beziehungen zwischen der NADH- bzw. NADP-Konzentration und der Reduktion des 2,6-Dichlorphenolindophenol bei der spektroskopischen Bestimmung der Pyridinnucleotide.



A: 1 ml 2,6-Dichlorphenolindophenol (0,18 mg)
0,05 ml Phenazinmethosulfat (0,05 mg)
1,4 ml Äthanol-Phosphatpuffer (pH 7,4)
0,2 ml der entsprechenden NADH-Lösung
0,05 ml Alkohol-Dehydrogenase (Boehringer) (1,5 mg)

B: 1 ml 2,6-Dichlorphenolindophenol (0,18 mg)
0,05 ml Phenazinmethosulfat (0,05 mg)
1,4 ml Glucose-6-phosphat-Trispuffer (pH 8,0)
0,1 ml der entsprechenden NADP-Lösung
0,15 ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Abb. 12 Bestimmungen von NAD und NADH aus Gemischen beider Coenzyme



A: Bestimmungen von NAD + NADH
B: Bestimmungen nach Extraktion des NAD
C: Bestimmungen nach Extraktion des NADH
D: Summe aus B und C

b. Gesamtkonzentrationen an NAD(H) und NADP(H): Um die Gesamtkonzentrationen an Nicotinamid-adenin-dinucleotid und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat in Hydrogenomonas H 16 zu bestimmen, wurden autotroph gewachsene Zellen am Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, mit Phosphatpuffer gewaschen und zu verschiedenen Zelldichten resuspendiert. Von jeder Suspension wurden mehrere saure und alkalische Extraktionen durchgeführt und die Konzentrationen der Pyridinnucleotide in den neutralisierten Extrakten bestimmt. Bei Abweichungen um 15 % innerhalb der einzelnen Messungen ergaben sich die in Tab. 7 zusammengefaßten Durchschnittswerte.

Tab. 7. Gesamtgehalt der Pyridinnucleotide bei Hydrogenomonas H 16.

Zelldichte (mg Tr.Gew./ ml)	NAD	NADH	NAD(H)	NADP	NADPH	NADP(H)	NADP(H)/ NAD(H)
		(µg/g Trockengewicht)					
0,52	643	244	887	-	-	-	-
1,05	655	226	881	-	-	-	-
2,01	675	257	932	-	-	-	-+)
4,13	644	212	856	59,4	23,3	82,7	0,09
8,09	697	227	924	83,7	17,9	101,6	0,10
Mittelwerte:	661	233	894	71,5	20,6	92,1	0,10

+) Die aus Suspensionen von Zelldichten unterhalb von 4,13 mg Tr.Gew./ml extrahierten NADP(H)-Konzentrationen lagen außerhalb der Erfassungsgrenze der Bestimmungsmethode.

Während der Ernte und des Waschens der Zellen werden die Nucleotide größenteils oxydiert. Die angeführten Werte geben daher nicht das wahre während des Wachstums vorliegende Redoxverhältnis wieder.

c. Intrazelluläre Redoxverhältnisse des Nicotinamid-adenin-dinucleotids: Um die im Fließgleichgewicht befindlichen Anteile an reduzierten und oxydierten Diphosphopyridinnucleotiden zu ermitteln, wurden Zellsuspensionen bei 30° unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und die Konzentrationen an NAD und NADH in den nach 30 Min. entnommenen und sofort extrahierten Proben bestimmt.

Tab. 8 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs, bei dem autotroph gewachsene Zellen von Hydrogenomonas H 16 unter der Bedingung der PHBS-Synthese und der Leerlaufreaktion inkubiert wurden.

Tab. 8. NAD(H)-Konzentrationen autotroph gewachsener, ruhender Zellen von Hydrogenomonas H 16 nach Inkubation unter Atmosphären verschiedener Zusammensetzung.

Atmosphäre	NAD	NADH	NAD(H)	NADH/NAD	NAD	NADH
	(mμmole/mg Tr.Gew.)				(% des Gesamtgehaltes)	
80 H_2, 20 O_2	43,6	61,2	104,8	1,40	42	58
75 H_2, 20 O_2	72,0	32,9	104,9	0,46	69	31
H_2	25,9	90,7	116,6	3,50	22	78
Luft	84,7	25,0	109,0	0,29	77	23

Gegenüber der Leerlaufreaktion, bei der 58 % der Pyridinnucleotide in reduzierter Form vorliegen, sinkt der Gehalt an NADH unter den Bedingungen der Speicherstoffsynthese auf 32 %. Diese Abnahme des reduzierten Pyridinnucleotids ist leicht verständlich, da bei Anwesenheit von CO_2 ein großer Teil des verfügbaren NADH als physiologisches Reduktionsmittel bei der CO_2-Fixierung verbraucht wird. Durch die in Gegenwart von CO_2 erfolgende erhöhte Gasaufnahme ist es den Zellen möglich, mit Hilfe ihrer löslichen Hydrogenase mit Wasserstoff NAD zu reduzieren

und für die CO_2-Fixierung zur Verfügung zu stellen. Parallel zu diesen Bestimmungen wurden die Redoxverhältnisse des Pyridinucleotids von Zellen ermittelt, die unter reinem Wasserstoff und unter Luft, das heißt unter extremen anaeroben und aeroben Bedingungen inkubiert waren. Während unter anaeroben Bedingungen 78 % des Pyridinnucleotids in reduzierter Form vorliegen, sind nach Inkubation an der Luft 77 % oxydiert.
Bemerkenswert ist, daß auch unter diesen extremen Bedingungen 1/5 des Nicotinamid-adenin-dinucleotids nicht verändert wird. Pyridinnucleotid-abhängige Dehydrogenasen binden NAD und NADH. Diese Assoziate besitzen unterschiedliche Dissoziationskonstanten (HOLZER 1958). Ein Teil der Coenzyme ist dadurch fest an Protein gebunden und von den freien, im Cytoplasma befindlichen Pyridinnucleotiden zu unterscheiden. Es ist anzunehmen, daß es sich bei den auch unter anaeroben Bedingungen im oxydierten und unter aeroben Bedingungen im reduzierten Zustand vorliegenden Pyridinnucleotiden in der Hauptsache um enzymgebundene Coenzyme handelt, die den durch die Umstellung des Stoffwechsels bedingten Veränderungen nicht direkt folgen. Damit sind die Unterschiede in den Redoxverhältnissen der freien Pyridinnucleotide während der Leerlaufreaktion und der Speicherstoffsynthese noch erheblich größer als sie in den gemessenen, freie und gebundene Pyridinnucleotide erfassenden Wertenzum Ausdruck kommen.
Bei den ersten physiologischen Untersuchungen über die Beschleunigung der Gasaufnahme in Gegenwart von CO_2 durch Zellen von Hydrogenomonas H 16 fand BARTHA (1962). daß die Gasaufnahme in Anwesenheit von CO_2 durch Hemmung mit Monojodessigsäure auf den Wert der Leerlaufreaktion zurückgeht. Monojodessigsäure ist als besonders wirksamer Inhibitor der Glycerinaldehydphosphat-Dehydro-

genase bekannt (HOLZER 1954). Durch die Hemmung dieses Enzyms muß die CO_2-Fixierung zum Stillstand kommen, weil der die Regenierung des Ribulose-1,5-diphosphat einleitende Schritt blockiert wird (s.Abb. 9). Während die Knallgasreaktion in Abwesenheit von CO_2 durch Monojodessigsäure ($1 \cdot 10^{-3}$M) nicht gehemmt wird, nimmt die in Gegenwart von CO_2 beschleunigte Gasaufnahme um 66 und die CO_2-Fixierung um 99,5 % ab (BARTHA 1962). Die in Tab. 9 angeführten Ergebnisse eines Versuchs, bei dem die intrazellulären NAD- und NADH-Konzentrationen von unter analogen Bedingungen inkubierten Zellen bestimmt wurden, zeigen, daß auch in diesem Fall die beobachteten Unterschiede in der Gasaufnahme von einer Änderung des Redoxverhältnisses der Pyridinnucleotide begleitet werden.

Tab. 9. Veränderung der NAD(H)-Konzentrationen durch Hemmung mit Monojodessigsäure.

Versuchsbedingungen	NAD (mμmole/mg Trocken-	NADH gewicht)	NAD(H)	NAD/NADH	NAD (in % v.Gesamtgeh.)	NADH
75 H_2,20 O_2,5 CO_2	63,0	53,1	116,1	1,44	59	41
75 H_2,20 O_2,5 CO_2 + Monojodessigs.	51,5	48,8	100,3	1,02	51	49
80 H_2, 20 O_2	56,2	66,3	122,5	0,85	46	54

Je 40 ml Suspension autotroph gewachsener Zellen von Hydrogenomonas H 16 in 0,066 M Phosphatpuffer, pH 7,0 (E 420 mμ 1,7, Tr.Gew. 0,321 mg/ml) wurden in 200 ml-Erlenmeyerkolben unter Schütteln bei 30° unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Nach 45 Min. wurden Proben entnommen und nach sofortiger Extraktion die NAD(H)-Konzentrationen bestimmt.

Durch Hemmung der NADH-verbrauchenden Reaktion der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase steigt der Gehalt an reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid an und nähert sich damit dem Redoxverhältnis der Zellen, die ohne CO_2 unter Knallgas inkubiert wurden.

III. Untersuchungen über die Hydrogenasen bei Hydrogenomonas (H 16)

1. Herstellung der zellfreien Extrakte.

Aus Vergleichen über die Wirksamkeit des Zellaufschlusses durch Ultraschallbehandlung und durch die Hughes-Presse (Tab.10) sowie über die in der löslichen Fraktion enthaltenen spezifischen Aktivitäten einiger Enzyme nach verschiedenen Aufschlußmethoden (Tab.11) wurde festgestellt, daß für Untersuchungen mit der löslichen und der partikulären Fraktion aus Hydrogenomonas H 16 die Zertrümmerung der Zellen mit Ultraschall am geeignetsten ist.

Tab. 10. Vergleich der Effektivität zwischen Ultraschall- und Hughepress-Aufschluß bei Zellen von Hydrogenomonas H 16.

	Ultraschall		Hughes-Presse	
Sediment (20',8000 g) (g Naßgewicht)	0,310		2,384	
	lösl.Frakt.	Partikel	lösl.Frak.	Partikel
Volumina der fraktionierten Extrakte (ml)	6	3	6	0,9
Protein (mg/ml)	11,2	9,1	4,9	1,2
Gesamtprotein (mg)	67,2	27,3	29,4	1,1
% vom eingesetzten Zellprotein	59	21	23	0,8

Je 3 ml einer Zell-Suspension von Hydrogenomonas H 16 (43 mg Tr.Gew./ml) wurden durch Ultraschall und Hughes-Presse aufgeschlossen.

Aus den in Tab.10 wiedergegebenen Daten geht hervor, daß nach Aufschluß der Zellen mit Ultraschall und nachfolgender fraktionierter Zentrifugation die höchsten Ausbeuten an löslichem Protein und Partikeln erhalten werden. Im Gegensatz dazu bleiben nach Zerstörung der Zellen mit der Hughes-Presse eine große Menge an intakt gebliebenen Zellen, Zelltrümmern und damit sedimentierenden Komponenten zurück, der Anteil an gelöstem Protein ist 2,6 mal niedriger als nach der Ultraschallbehandlung; Partikeln lassen sich kaum isolieren.
Nach Aufschluß der Zellen mit der Hughes-Presse oder nach Zerreiben der Zellen mit Alumina erhält man RNS- und DNS-reiche, viskose Extrakte, in denen die Partikeln und, wie aus Tab.11 ersichtlich, zum Teil auch die an kleine Partikeln assoziierte lösliche Hydrogenase während des Zentrifugierens sedimentierten.

Tab. 11. Enzymaktivitäten in den nach unterschiedlichen Arten des Zellaufschlusses erhaltenen löslichen Fraktionen aus autotroph gewachsenen Zellen von Hydrogenomonas H 16 (Angaben in mE/mg Protein).

Enzym	Ultraschall	Hughes-Presse	Alcoa-A303
Hydrogenase, lösl.	156	24	32
$NADH_2$-Oxydase	11	19	15
$NADPH_2$-Oxydase	5	7	5
Malat-Dehydrogenase	1500	1700	1650
Lactat-Dehydrogenase	47	44	51

2. Methoden zur Bestimmung der löslichen Hydrogenase.

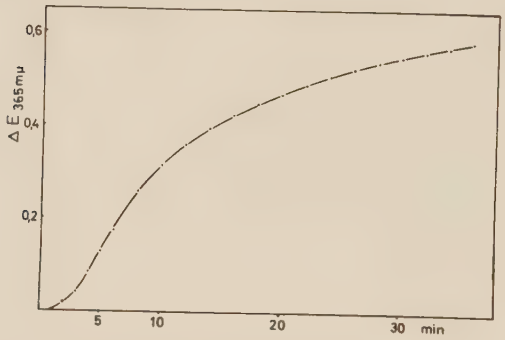
Die durch differentielle Zentrifugation des Rohextraktes gewonnene lösliche Fraktion enthält eine Hydrogenase, deren Aktivität in Thunbergküvetten unter Wasserstoff durch spektroskopische Verfolgung der NAD-Reduktion

(Abb.13), durch manometrische Verfolgung der Wasserstoffaufnahme mit Methylenblau (Abb.14) und mit NAD in Substratmengen (Abb.15), oder mit katalytischen Mengen an NAD in gekoppelter Reaktion mit Pyruvat-Lactatdehydrogenase (Abb.16) und mit Phenazinmethosulfat (Abb.17) gemessen werden kann.

3. Eigenschaften der löslichen Hydrogenase.

Die durch die lösliche Hydrogenase katalysierte Reduktion von NAD mit Wasserstoff erfolgt innerhalb eines breiten pH-Bereichs zwischen pH 5 und 8,5 mit einem wenig ausgeprägten pH-Optimum bei pH 7,8 (Abb.18). Während eine Präinkubation mit FMN ($5 \cdot 10^{-6}$M) und in schwächerem Maße mit FAD eine geringfügige Verkürzung der Anlaufphase und eine Erhöhung der Geschwindigkeit der NAD-Reduktion verursacht, beeinflußt Riboflavin die Reaktion nicht (Abb.19). Stimulierend auf die Hydrogenaseaktivität wirken außerdem noch Fe^{2+}-Ionen. FMN u. Fe^{2+}, werden anscheinend von der Hydrogenase als Cofaktoren sehr fest gebunden, da Atebrin und EDTA die Aktivität weder hemmen noch bei gleichzeitigen Zusätzen die durch FMN und Fe^{2+} verursachte Aktivierung vermindern.
In Tab.12 sind die Einflüsse einiger Inhibitoren auf die durch die lösliche Hydrogenase katalysierte NAD-Reduktion mit molekularem Wasserstoff zusammengefaßt. Die starke Hemmung mit p-Chlormercuribenzoat weist auf eine Beteiligung von Sulfhydrylgruppen hin. Eine Hemmung der Hydrogenase mit p-Chlormercuribenzoat wurde auch bei H.ruhlandii (BERNSTEIN u. VISHNIAK 1959), H. facilis (ATKINSON u. McFADDEN 1954) und H. eutropha (REPASKE 1962) festgestellt. Dagegen scheint die von diesen Autoren beobachtete Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff bei der löslichen Hydrogenase von Hydroge-

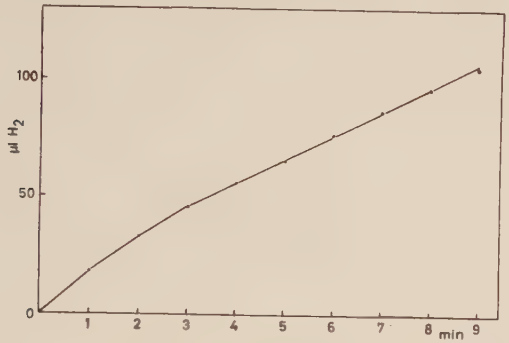
Abb. 13 Zeitlicher Verlauf der durch die lösliche Fraktion aus Hydrogenomonas H 16 katalysierten NAD-Reduktion.



Die Messung erfolgte in einer evakuierten und mit Wasserstoff gespülten Thunbergküvette.

Hauptraum:	Trispuffer (pH 7,8)	200 µmole
	Lösliche Fraktion	2,79 mg Protein
Seitenarm:	NAD	0,6 µmole
Gesamtvolumen:	3 ml	

Abb. 14 Zeitlicher Verlauf der Wasserstoffaufnahme bei der Reduktion von Methylenblau.

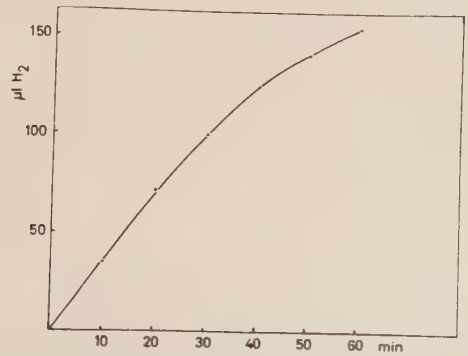


Hauptraum: Phosphatpuffer (pH 7,5) 120 µmole
Lösliche Fraktion 0,58 mg Protein

Seitenarm: Methylenblau 20 µmole
Volumen: 2 ml

Atmosphäre: Wasserstoff; Temperatur: 30°

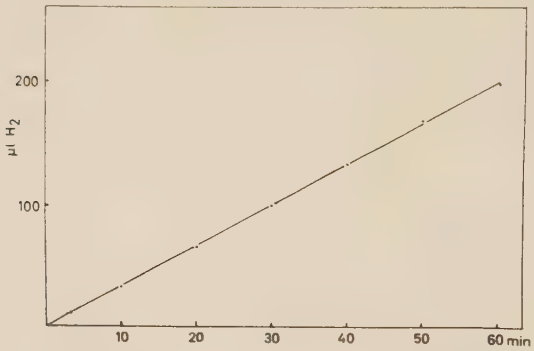
Abb. 15 Zeitlicher Verlauf der Wasserstoffaufnahme bei der durch die lösliche Fraktion katalysierten NAD-Reduktion.



Hauptraum: Phosphatpuffer (pH 7,5) 120 µmole
Lösliche Fraktion 0,49 mg Protein

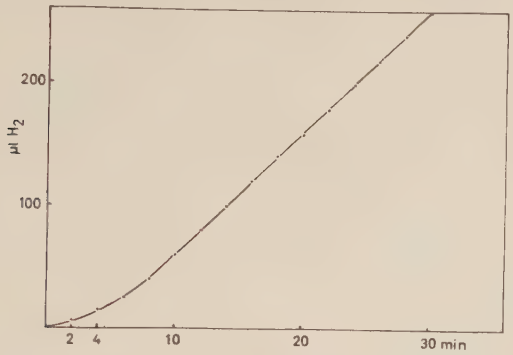
Seitenarm: NAD 10 µmole
Volumen: 2 ml Atmosphäre: Wasserstoff; Temperatur: 30°

Abb. 16 Zeitlicher Verlauf der Wasserstoffaufnahme bei der durch die lösliche Fraktion katalysierten mit Pyruvat-LDH gekoppelten NAD-Reduktion.



Hauptraum:	Phosphatpuffer (pH 7,5)	120 µmole
	Lösliche Fraktion	0,71 mg Protein
	Rinderserumalbumin	4 mg
	Eisenammoniumsulfat	5 µmole
	FMN	0,01 µmole
	Natriumpyruvat	30 µmole
	NAD	3 µmole
Seitenarm:	Lactat-Dehydrogenase (Boehringer)	1000 Einheiten
Volumen:	2 ml	
Atmosphäre:	Wasserstoff; Temperatur:	30°

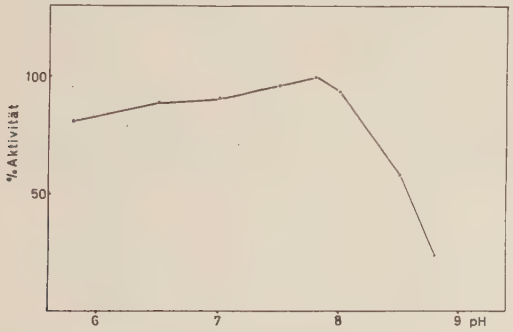
Abb. 17 Zeitlicher Verlauf der Wasserstoffaufnahme bei der durch die lösliche Fraktion katalysierten mit Phenazinmethosulfat gekoppelten NAD-Reduktion.



Hauptraum:	Phosphatpuffer (pH 7,5)	120 µmole
	Lösliche Fraktion	1,94 mg Protein
Seitenarm:	NAD	3 µmole
	Phenazinmethosulfat	30 µmole

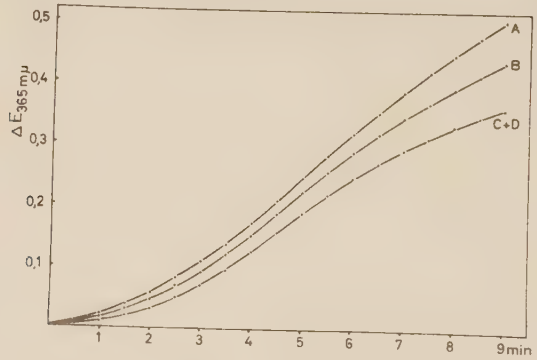
Volumen: 2 ml Atmosphäre:Wasserstoff;Temperatur: 30°

Abb. 18 pH-Abhängigkeit der durch die lösliche Fraktion katalysierten NAD-Reduktion.



Durchführung wie bei Abb.13. Die bei den verschiedenen pH-Werten erhaltenen spezifischen Aktivitäten wurden zu der höchsten Aktivität bei pH 7,8 in prozentuale Beziehung gesetzt.

Abb. 19 Einfluß von FMN, FAD und Riboflavin auf den Verlauf der NAD-Reduktion.



Durchführung der Messung wie bei Abb.13

Lösliche Fraktion 2,07 mg Protein
A: FMN (0,005 µmole) C: ---
B: FAD (0,005 µmole) D: Riboflavin (0,005 µmole)

Tab. 12. Wirkung einiger Inhibitoren auf die Aktivität der löslichen Hydrogenase.

Hemmstoff	Konzentration im Ansatz	Prozentuale Hemmung
Atebrin	$2 \cdot 10^{-4}$ M	keine
Azid	$1 \cdot 10^{-3}$ M	keine
EDTA	$1 \cdot 10^{-3}$ M	keine
Fe^{3+}	$1 \cdot 10^{-6}$ M	keine
Sulfid	$1{,}2 \cdot 10^{-4}$ M	50
p-Chlormercuri-benzoat	$3 \cdot 10^{-5}$ M	50
$HgCl_2$	$3 \cdot 10^{-6}$ M	50

nomonas H 16 weniger ausgeprägt zu sein. So konnte bei der Bestimmung der NAD-Reduktion in Thunbergküvetten der Wasserstoff durch Wasserstoff-Sauerstoff Gemische bis zu einem Anteil von 50 % Sauerstoff ersetzt werden, ohne daß eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit eintrat. Reduzierende Agenzien wie Glutathion, Dimercaptopropanol (BAL) und Cystein hatten keinen Einfluß auf Verlauf und Aktivität der Hydrogenasereaktion, und Fe^{3+}-Ionen bewirkten im Gegensatz zum Hydrogenasesystem bei Clostridium pasteurianum (FREDRICKS u. STADTMANN 1965) weder eine Verlängerung der Anlaufphase noch eine Hemmung der NAD-Reduktion.

Bei einer Untersuchung über den Einfluß der einzelnen Komponenten eines bei manometrischen Hydrogenasebestimmungen verwendeten, aus Cystein, FMN, Rinderserumalbumin und Fe^{2+} bestehenden komplexen Ansatzes trat in einigen Fällen eine Hemmung durch Cystein auf, beispielsweise um 25 % durch $5 \cdot 10^{-3}$M Cystein. Ferner wurde beobachtet, daß beim Altern zellfreier Extrakte in verstärktem Maße eine Bildung von Schwefelwasserstoff einsetzte, wenn den entsprechenden Zellsuspensionen vor der Ultraschallbehandlung EDTA und Cystein zugesetzt waren. Da die lösliche Hydrogenase durch Sulfid gehemmt wird (Tab.12), ist anzunehmen, daß der hemmende Einfluß von Cystein auf die Wirkung des Sulfids zurückzuführen ist, das in den Extrakten durch eine Cysteindesulfhydrase gebildet werden kann. Ebenso ist der allmähliche Aktivitätsabfall von löslichen Fraktionen nach längerem Aufbewahren bei 4° eher auf die Hemmwirkung des gebildeten Sulfids als auf eine Inaktivierung der Hydrogenase durch Luftsauerstoff zurückzuführen, zumal bei einem Extrakt, der längere Zeit unter Wasserstoff aufbewahrt wurde, ein ähnlicher Aktivitätsverlust auftrat. Da sich die aus einer alkalischen Lösung von Anthrachinon-ß-sulfonat und Natriumdithionit bestehen-

de, zur Absorption von Sauerstoff und Kohlendioxyd dienende Fieserlösung auch unter Bildung von Schwefelwasserstoff zersetzt, wurde in späteren Versuchen auf Zusätze von Cystein und die Verwendung von Fieserlösung bei manometrischen Messungen verzichtet.

4. Eigenschaften der partikelgebundenen Hydrogenase

Ebenso wie die durch die Partikelfraktion katalysierte Wasserstoffoxydation mit Ausnahme von Menadion durch physiologische Verbindungen nicht zu beeinflussen ist, wird auch die durch Reduktion von Methylenblau meßbare partikelgebundene Hydrogenase selbst durch Flavinnucletide, Pyridinnucleotide und Fe^{2+} nicht verändert.

Außer Methylenblau sind eine Reihe weiterer synthetischer Verbindungen in der Lage, bei der Bestimmung der partikulären Hydrogenaseaktivität als Wasserstoffakzeptoren zu fungieren. Während Dichlorphenolindophenol mit gleicher Effektivität wie Methylenblau reagiert, werden mit abnehmender Wirksamkeit auch Kaliumferricyanid, Janusgrün und in geringem Maße Triphenyltetrazoliumchlorid reduziert.
Als physiologische Akzeptoren sind nur Sauerstoff und - infolge der Autoxydabilität seiner reduzierten Form - Menadion wirksam. Sauerstoff ist jedoch der Endakzeptor einer mit der Aktivierung des Wasserstoffs beginnenden Elektronentransportkette, und Menadion stellt mit der Menadion-Reductase, durch die Menadion mit NADH reduziert wird, nur ein Segment dieser Elektronentransportkette dar.
Um die Frage nach dem physiologischen Akzeptor der partikelgebundenen Hydrogenase weiter zu untersuchen, wurden Versuche unternommen, die Hydrogenase von den Partikeln abzulösen, um zu prüfen, ob sie in gelöster Form fähig ist, NAD mit Wasserstoff zu reduzieren.

5. Versuche zur Solubilisierung der partikelgebundenen Hydrogenase

Die Methoden, die angewendet werden, um partikelgebundene Enzyme in Lösung zu bringen, beruhen auf Veränderungen der strukturerhaltenden Bindungskräfte durch Einwirkung konzentrierter Salze und Änderungen des pH-Wertes oder auf einer Zerstörung der Membranstruktur durch Extraktion der in ihnen enthaltenen Phospholipide.

Nachdem Einwirkungen von Desoxycholat und Extraktion mit Butanol (EBERHARDT 1965) sowie eine Behandlung der Partikel mit einer 8 M Harnstoff-Lösung zu einer Inaktivierung der Hydrogenase geführt hatten, gelang es nach zwei verschiedenen Methoden, die partikelgebundenen Hydrogenaseaktivität teilweise von den Partikeln abzulösen.

Einem Hinweis über die Solubilisierung einer partikulären Hydrogenase bei Vibrio succinogenes (ASPEN u. WOLIN 1965) folgend, wurden gewaschene Partikel von Hydrogenomonas H 16 in 0,06 M Tris-Puffer, pH 11,0 und zur Kontrolle in 0,06 M Phosphatpuffer, pH 7,0 eine Stunde lang bei 30° inkubiert und die Ansätze durch einstündiges Zentrifugieren bei 100 000 g erneut in Partikelfraktionen und überstehende Fraktionen getrennt.

Tab. 13. Versuch einer Solubilisierung der strukturgebundenen Hydrogenaseaktivität bei pH 11,0.

Fraktion (nach Inkubation)	Protein (mg/ml)	Hydrogenase-Aktivität NAD-Reduktion	Methylenblau-Reduktion (μl H_2/Std. u. mg Prot.)
pH 11,0-Partikel	5,5	0	870
pH 11,0-Überstand	4,3	0	360
pH 7,0-Partikel	8,0	0	1150
pH 7,0-Überstand	0,33	0	1240

Gleiche Mengen einer gewaschenen Partikelfraktion von Hydrogenomonas H 16 wurden in 3 ml 0,06 M Tris-Puffer (pH 11,0) und zur Kontrolle in 3 ml 0,06 M Phosphatpuffer (pH 7,0) suspendiert, eine Std. bei 30° inkubiert und durch Zentrifugieren (1 Std., 100 000 g, 2°) in Partikelfraktionen und überstehende Fraktionen getrennt.

Wie aus Tab.13 zu ersehen ist, geht während der Inkubation bei pH 11,0 ungefähr die Hälfte des Proteins in Lösung. Die an den Partikeln verbleibende Hydrogenase ist im Vergleich zur Kontrolle etwas geschädigt. Das von den Partikeln gelöste Protein enthält eine durch Reduktion von Methylenblau erfaßbare Hydrogenaseaktivität, die aber wie in der strukturgebundenen Form nicht fähig ist, NAD zu reduzieren.

In ähnlicher Weise gelang es auch durch Dialyse der Partikelfraktion von Hydrogenomonas H 16 gegen einen aus 0,01 M Tris-HCl (pH 7,3), 0,1 M NaCl und 4 M Dimercaptopropanol bestehenden sogenannten SH-Puffer, Protein mit der Fähigkeit Methylenblau, nicht aber NAD mit Wasserstoff zu reduzieren, in Lösung zu bringen.

Wurden die löslichen Fraktionen aus Hydrogenomonas H 16 den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen, trat bei der Einwirkung von 8 M Harnstoff-Lösung ebenfalls eine Inaktivierung der Enzymaktivität ein.

Während der Inkubation bei pH 11 und während der Dialyse gegen den SH-Puffer blieb dagegen die löslichen Hydrogenase in ihrer Fähigkeit, NAD zu reduzieren, erhalten. Die von den Partikeln gelöste Hydrogenase ist sehr instabil. Die spezifische Aktivität nahm innerhalb von 2 Stunden nach der Zentrifugation um die Hälfte ab. Eine Rekombination des gelösten Proteins mit den zurückgebliebenen Partikeln durch eine zweite Inkubation unter den Kontrollbedingungen trat nicht ein.

6. Verteilung und Eigenschaften der Hydrogenase bei Hydrogenomonas ruhlandii und Hydrogenomonas facilis

Durch Ultraschallbehandlung gewonnene Rohextrakte aus autotroph gewachsenen Zellen von Hydrogenomonas ruhlandii und Hydrogenomonas facilis wurden wie bei Hydrogenomonas H 16 durch differentielle Zentrifugation in lösliche und partikuläre Fraktionen aufgetrennt. Während die lösliche Fraktion aus H. ruhlandii sowohl die Reduktion von NAD als auch von Methylenblau mit Wasserstoff und die Partikelfraktion nur die Reduktion von Methylenblau, nicht aber die von NAD katalysiert, sind lösliche Fraktion und Partikelfraktion aus H. facilis nur zur Reduktion von Methylenblau fähig (Tab.14).

Tab.14 Verteilung der Hydrogenase-Aktivitäten bei verschiedenen Knallgasbakterien.

	Hydrogen. H 16		H.ruhlandii		H.facilis	
	Lösl.Fr.	Part.fr.	Lösl.Fr.	Part. fr.	Lösl.Fr.	Part. fr.
NAD-Reduktion	+	-	+	-	-	-
Methylenblau-Reduktion	+	+	+	+	+	+

Beide Fraktionen können mit Wasserstoff NAD nicht reduzieren. Das lösliche und partikuläre Elektronentransportsystem von H. ruhlandii gleicht denen bei Hydro-

genomonas H 16 auch in den spezifischen Aktivitäten der beiden Hydrogenasen, im kinetischen Verhalten der durch die lösliche Fraktion katalysierten NAD-Reduktion und hinsichtlich der Fähigkeit, eine Knallgasreaktion zu katalysieren. Dagegen blieben auch Zusätze von FMN, Fe^{2+}, Dimercaptopropanol und Glutathion einzeln oder in Kombination ohne Einfluß auf das von Hydrogenomonas H 16 und H. ruhlandii abweichende Unvermögen der löslichen Fraktion von H. facilis, NAD mit Wasserstoff zu reduzieren. Allen löslichen Fraktionen aus H. ruhlandii, H. facilis und Hydrogenomonas H 16 gemein ist lediglich eine nach wenigen Minuten einsetzende Hemmung der Reduktion von Methylenblau.

IV. Die Kinetik der NAD-Reduktion.

1. Der zeitliche Verlauf der NAD-Reduktion.

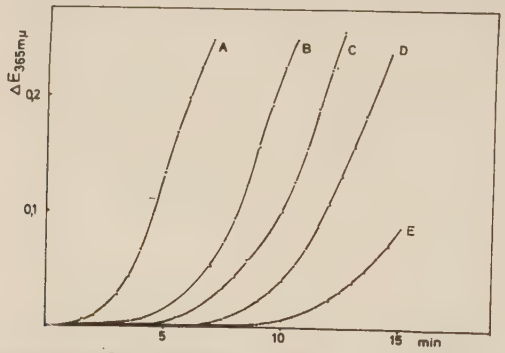
Bei der Aktivitätsbestimmung der löslichen Hydrogenase, bei welcher die Reaktion nach dem Evakuieren und Begasen der Thunbergküvette mit Wasserstoff durch Zugabe einer NAD-Lösung aus dem Seitenarm gestartet und die zeitliche Extinktionszunahme bei 365 mμ spektrophotometrisch verfolgt wurde, ergab sich der in Abb.14 dargestellte Reaktionsverlauf. Im Gegensatz zur Kinetik der meisten anderen Enzyme verläuft die durch die lösliche Hydrogenase katalysierte NAD-Reduktion über keinen längeren Zeitabschnitt linear. Die Reaktion benötigt eine von der NAD- und Proteinkonzentration unabhängige mehr oder weniger stark ausgeprägte Anlaufphase. Die am Ende dieser Anlaufphase erreichte höchste spezifische Aktivität wird nur eine kurze Zeit hindurch beibehalten. Danach nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit kontinuierlich ab, obwohl das Gleichgewicht der Reaktion ganz auf der Seite des reduzierten Pyridinnucleotids liegt und zu diesem

Zeitpunkt erst ein geringer Teil des NAD reduziert ist. Die bei der photometrischen NAD-Reduktion beobachtete Anlaufphase ist auch bei manometrischen Hydrogenasebestimmungen zu beobachten, wenn die Reaktion durch Zugabe von NAD aus dem Seitenarm gestartet wird. Dagegen tritt bei manometrischen Bestimmungen der löslichen Hydrogenaseaktivität mit Methylenblau als Wasserstoffakzeptor keine Anlaufphase auf (Abb.15). Die Geschwindigkeit der Wasserstoffaufnahme nimmt in den ersten Minuten ab, verläuft dann aber linear.
Bemerkenswert ist, daß das Phänomen einer kontinuierlichen Abnahme der spezifischen Hydrogenaseaktivität während der NAD-Reduktion nur bei der manometrischen Bestimmung mit NAD in Substratmengen zu beobachten ist (Abb.16). Bei der Reoxydation des mit Wasserstoff reduzierten Pyridinnucleotids durch Kopplung mit Pyruvat-LDH (Abb.17) oder Phenazinmethosulfat (Abb.18) verläuft die Wasserstoffaufnahme nach Einstellung eines Gleichgewichts über mindestens 30 Minuten linear.

2. Untersuchungen über die Anlaufphase.

Da die Dauer der Anlaufphase beim Altern (Abb.20) und durch Dialyse (Abb.21) der löslichen Fraktionen zunimmt, war anzunehmen, daß die Länge der lag-Phase mit der Dissoziation eines von der löslichen Hydrogenase relativ fest gebundenen Cofaktors im Zusammenhang steht.
Die Anlaufphase, die bei der Reduktion von NAD durch zellfreie Extrakte von H. ruhlandii auftritt, kann durch Präinkubation mit H_2 oder NADH eliminiert werden (BONE 1963). Im Falle von Hydrogenomonas H 16 hatte eine Präinkubation der löslichen Fraktion mit Wasserstoff jedoch keinen Einfluß auf den Verlauf der NAD-Reduktion. Auch bei der Präinkubation mit Wasserstoff einer in analoger Weise aus autotroph gewachsenen

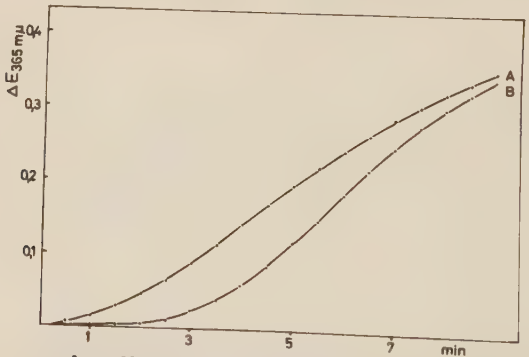
Abb.20 Abhängigkeit der Dauer der Anlaufphase bei der NAD-Reduktion vom Alter der löslichen Fraktion.



Die Messungen wurden jeweils mit 1,92 mg Protein wie bei Abb.13 zu folgenden Zeiten nach der Gewinnung der löslichen Fraktion durchgeführt:

A: 30 Minuten B: 24 Stunden C: 48 Stunden
D: 6 Tage E: 18 Tage

Abb.21. Beeinflussung der bei der NAD-Reduktion auftretenden Anlaufphase durch Dialyse.

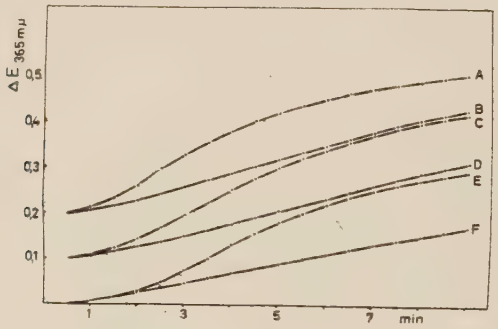


Durchführung der Messungen wie bei Abb.13 mit 3,4 mg Protein der löslichen Fraktion.

A: nach 15 stündigem Aufbewahren bei 4°
B: nach 15 stündiger Dialyse gegen 0,06 M Phosphatpuffer (pH 7) bei 4°

Zellen von H. ruhlandii erhaltenen löslichen Fraktion trat lediglich eine Verkürzung der Anlaufphase ein. Eine völlige Eliminierung der lag-Phase erfolgte jedoch in beiden Fällen durch Präinkubation mit NADH.
Hinweise auf den Wirkungsmechanismus des reduzierten Pyridinnucleotids ergeben sich aus den in Abb.22 dargestellten Untersuchungen. Wird die Reaktion nach dem Evakuieren und Begasen der Thunbergküvette mit Wasserstoff durch Zugabe eines NAD/NADH-Gemisches aus dem Seitenarm, d.h. ohne Präinkubation mit NADH gestartet, so erfolgt eine von der NADH-Konzentration abhängige Verkürzung der Anlaufphase. Werden die entsprechenden Mengen an NADH aber in den Hauptraum der Thunbergküvette mit der löslichen Fraktion zusammengegeben und wird die Reaktion dann nach Evakuieren und Begasen durch Zugabe von NAD aus dem Seitenarm, d.h. nach Präinkubation mit NADH gestartet, so beginnt die NAD-Reduktion (im Bereich von $1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-7}$ M NADH unabhängig von der NADH-Konzentration) linear. Die ohne Präinkubation mit NADH erhaltene maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird dabei jedoch nicht erreicht.
Die Eliminierung der Anlaufphase durch Präinkubation mit NADH sowie die Verkürzung der Anlaufphase durch Zugabe von NADH zu Beginn der NAD-Reduktion lassen sich durch die Annahme erklären, daß die lösliche Hydrogenase in einen reaktionsfähigen Zustand oder in eine reaktionsfähige Form umgewandelt wird. Diese Aktivierung des Enzyms ist nicht mit einer Reduktion der aktiven Zentren der Hydrogenase gleichzusetzen, da eine Präinkubation mit Wasserstoff allein oder mit den reduzierenden Agenzien Glutathion, Dimercaptopropanol und Cystein den mit NADH erzielten Effekt nicht ersetzen kann, und umgekehrt, ein Zusatz von Fe^{3+} als Oxydationsmittel weder zu einer Aktivitätsminderung noch zu einer Verlängerung der Anlaufphase führt. Eine Präinkubation unter Wasserstoff ist nur

Abb. 22 Veränderungen des zeitlichen Verlaufs der durch die lösliche Fraktion aus Hydrogenomonas H 16 katalysierten NAD-Reduktion durch NADH.



Thunbergküvette

Hauptraum:	Tris-Puffer (pH 7,8)	200 µmole
	Lösliche Fraktion	3,5 mg Protein
	NADH	(wie angegeben)
Seitenarm:	NAD	0,6 µmole
	NADH	(wie angegeben)

Gesamtvolumen: 3 ml

Atmosphäre: Wasserstoff

A: 0,2 µmole NADH im Seitenarm

B: 0,2 µmole NADH im Hauptraum

C: 0,04 µmole NADH im Seitenarm

D: 0,04 µmole NADH im Hauptraum

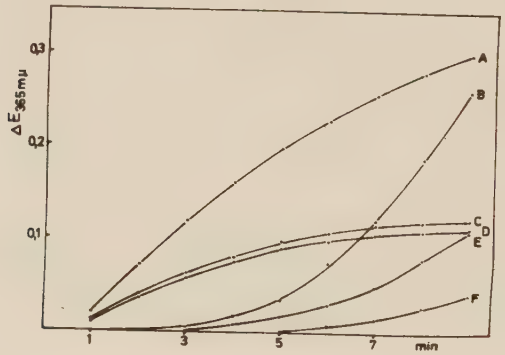
E: 0,02 µmole NADH im Seitenarm

F: 0,02 µmole NADH im Hauptraum

(Die Anfangswerte der Kurven wurden willkürlich versetzt, um eine Überschneidung zu vermeiden)

in Gegenwart von genügend NAD wirkungsvoll, das durch die Hydrogenase zu NADH reduziert wird.
Die ohne Präinkubation mit NADH beobachtete lag-Phase kann dadurch erklärt werden, daß nach Zugabe des NAD aus dem Seitenarm nur die Hydrogenasemoleküle reagieren, die noch gebundenes NAD enthielten, welches während des Begasens der Küvette zu NADH reduziert wurde. NADH, das Reaktionsprodukt der am Anfang reagierenden wenigen "aktivierten" Enzymmoleküle, dient nun im Augenblick seiner Ablösung von der Enzymoberfläche weiteren Hydrogenasemolekülen zur Reaktivierung. Diese fallen sukzessive in die Reaktion ein. Der Vorgang ist eine Autokatalyse, die Anlaufphase ihr spektroskopisch erfaßbarer Ausdruck.
Aus Versuchen über den Einfluß des Hemmstoffes p-Chlormercuribenzoat auf die Kinetik der NAD-Reduktion (Abb.23) geht hervor, daß die durch Präinkubation mit NADH verursachte Veränderung des Reaktionsablaufes auch bei partieller Hemmung der Hydrogenase erhalten bleibt. In Abwesenheit von NADH führt eine Präinkubation mit dem Inhibitor zu einer zusätzlichen Verlängerung der Anlaufphase. Auch dieser Befund läßt sich mit der Hypothese einer mit einer Enzymmodifizierung verbundenen Aktivierung der Hydrogenasemoleküle durch NADH erklären. Durch die Einwirkung von p-Chlormercuribenzoat ist beim Start der Reaktion mit NAD ein Teil der durch endogene Pyridinnucleotide aktivierten Enzymmoleküle durch Blockierung der Thiolgruppen im aktiven Zentrum vergiftet. Da diese Enzymmoleküle für den autokatalytischen Prozeß ausfallen, muß sich die Anlaufphase verlängern. Da die Reaktionen nach Präinkubation mit NADH in Gegenwart von p-Chlormercuribenzoat, unabhängig davon, ob der Inhibitor während der Präinkubation anwesend war oder erst beim Start der

Abb. 23 Einfluß von p-Chlormercuribenzoat auf die Kinetik der NAD-Reduktion.



Thunbergküvette

Hauptraum:	Tris-Puffer (pH 7,8)	200 µmole
	Lösliche Fraktion	3,28 mg Protein
	NADH	(wie angegeben)
	p-CMB	(wie angegeben)
Seitenarm:	NAD	0,6 µmole
	NADH	(wie angegeben)
	p-CMB	(wie angegeben)

Gesamtvolumen: 3 ml Atmosphäre: Wasserstoff

A: 0,2 µmole NADH im Hauptraum

B: ---

C: 0,2 µmole NADH im Hauptraum und 0,15 µmole p-CMB im Seitenarm

D: 0,2 µmole NADH und 0,15 µmole p-CMB im Hauptraum

E: 0,15 µmole p-CMB im Seitenarm

F: 0,15 µmole p-CMB im Hauptraum

Reaktion mit dem NAD zugegeben wird, ähnlich verlaufen, kann man schließen, daß an der durch NADH bewirkten Umwandlung des Enzyms in die aktive Form keine SH-Gruppen beteiligt sind.

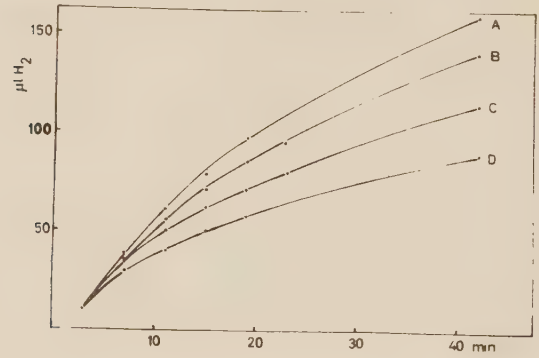
Es wurde bereits erwähnt, daß die durch die lösliche Fraktion katalysierte Methylenblaureduktion mit Wasserstoff keine Anlaufphase besitzt. Die in den ersten Minuten auftretende Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit einer Schädigung der löslichen Hydrogenase durch Methylenblau erklärt (EBERHARDT 1965). Abb.24 zeigt, daß eine Präinkubation der löslichen Fraktion mit NADH die Methylenblaureduktion dadurch stimuliert, daß die Reaktionsgeschwindigkeit am Anfang weniger stark abnimmt. Das durch NADH modifizierte Enzym scheint also gegenüber der schädigenden Einwirkung des Methylenblau stabiler zu sein.

3. Produkthemmung der löslichen Hydrogenase

Nachdem die vorstehend beschriebenen Versuche das Auftreten einer Anlaufphase bei der durch die lösliche Fraktion katalysierten NAD-Reduktion mit einer durch geringe Mengen an NADH ($< 1 \cdot 10^{-5}$M) verursachten Enzymmodifikation erklärt haben, soll nun die Frage untersucht werden, warum die spezifische Aktivität der löslichen Hydrogenase nach Erreichen der höchsten Reaktionsgeschwindigkeit am Ende der Anlaufphase im weiteren Verlauf der NAD-Reduktion kontinuierlich abnimmt und warum nach Eliminierung der Anlaufphase durch Präinkubation mit NADH die NAD-Reduktion mit einer geringeren maximalen spezifischen Aktivität erfolgt.

Das Gleichgewicht der durch die Hydrogenase katalysierten Reaktion liegt weit auf der Seite des reduzierten Pyridinnucleotids. Die Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit beginnt aber schon zu einem Zeitpunkt, an dem erst ein

Abb. 24 Stimulierung der durch die lösliche Fraktion katalysierten Methylenblau-Reduktion durch NADH



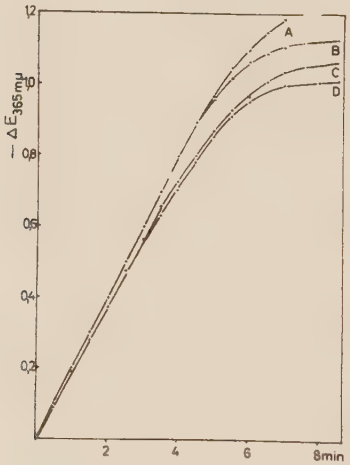
Hauptarm:	Phosphatpuffer (pH 7,5)	120 µmole
	Lösliche Fraktion	0,93 mg Protein
	NADH	(wie angegeben)
Seitenarm:	Methylenblau	20 µmole

Gesamtvolumen: 2 ml Atmosphäre: Wasserstoff
Temperatur: 30°

A: 1,8 µmole NADH
B: 0,6 µmole NADH
C: 0,3 µmole NADH
D: ohne NADH

geringer Teil des Substrats umgesetzt ist. Daher kann die zu beobachtende Abnahme der spezifischen Aktivität nicht mit einer frühzeitig einsetzenden Rückreaktion erklärt werden.
Abb.25 zeigt zum Vergleich die Kinetik der durch Lactat-Dehydrogenase katalysierten Reduktion von Pyruvat mit NADH. Obwohl in diesem Fall das Gleichgewicht weniger weit auf der Seite der Reaktionsprodukte liegt, werden die Reaktionsgeschwindigkeiten nur wenig beeinflußt, wenn die Reaktion nicht mit den Substraten allein, sondern mit Gemischen aus den Substraten Pyruvat und NADH und dem einen Reaktionsprodukt (NAD) gestartet wird.
Die Kinetik der löslichen Hydrogenasereaktion zeigt dagegen ein völlig anderes Bild, wenn dem Reaktionsgemisch über die zur Eliminierung der Anlaufphase erforderlichen Menge hinaus NADH zugesetzt wird. Startet man die Reaktion mit NAD/NADH-Gemischen, d.h. ohne Präinkubation (Abb.26), so nimmt die Geschwindigkeit der NAD-Reduktion umso früher und stärker ab, je höher der Anteil an NADH ist. Noch ausgeprägter verläuft die Hemmung der Reaktion nach Präinkubation mit größeren Mengen an NADH (Abb.27).
Während die lösliche Hydrogenase also durch geringe Konzentrationen ihres Reaktionsproduktes NADH aktiviert wird, verursachen größere Mengen des Reaktionsproduktes eine Hemmung. Nachdem alle Hydrogenasemoleküle während der Anlaufphase durch das zunächst entstehende NADH aktiviert worden sind, nimmt die Geschwindigkeit der NAD-Reduktion im weiteren Verlauf kontinuierlich ab, da die zunehmende NADH-Konzentration die Hydrogenase hemmt. Nach Präinkubation mit NADH sind zu Beginn der Reaktion alle Enzymmoleküle aktiviert und zum Teil schon durch die die Aktivierung übersteigende Menge an NADH gehemmt. Die Reaktion benötigt nun zwar keine

Abb. 25 Zeitlicher Verlauf der Lactat-Dehydrogenase-Reaktion in Anwesenheit verschiedener NAD-Konzentrationen



Thunbergküvette

Hauptraum:	Tris-Puffer (pH 7,8)	200 µmol
	Natriumpyruvat	0,8 mg
	LDH (Boehringer)	10 Bücher-Einheiten
	NAD	(wie angegeben)
Seitenarm:	NADH	1,34 mg

Volumen: 3 ml Atmosphäre: Luft

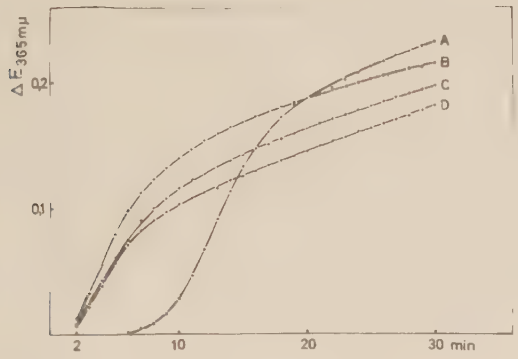
A: ohne NAD

B: 0,33 mg NAD (25% des Pyridinnucleotid-Gehalts)

C: 0,66 mg NAD (40% des Pyridinnucleotid-Gehalts)

D: 1 mg NAD (50% des Pyridinnucleotid-Gehalts)

Abb.26 Verlauf der NAD-Reduktion ohne Präinkubation in Anwesenheit verschiedener NADH-Konzentrationen



Thunbergküvette

Hauptraum:	Tris-Puffer (pH 7,8)	200 µmole
	Lösliche Fraktion	1,47 mg Protein
Seitenarm:	NAD	0,4 µmole
	NADH	(wie angegeben)

Gesamtvolumen: 3 ml Atmosphäre: Wasserstoff

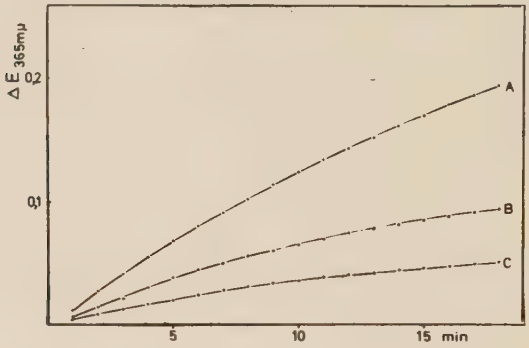
A: Ohne NADH

B: 0,1 µmole NADH (20% des Pyridinnucleotid-Gehalts)

C: 0,2 µmole NADH (33,3% des Pyridinnucleotid-Gehalts)

D: 0,6 µmole NADH (60% des Pyridinnucleotid-Gehalts)

Abb.27 Verlauf der NAD-Reduktion mit Präinkubation in Anwesenheit verschiedener NADH-Konzentrationen



Thunbergküvette

Hauptraum:	Tris-Puffer	200 µmole
	Lösliche Fraktion	1,52 mg Protein
	NADH	(wie angegeben)
Seitenarm:	NAD	0,6 µmole

Gesamtvolumen: 3 ml Atmosphäre: Wasserstoff

A: 0,2 µmole NADH (25% des Pyridinnucleotid-Gehalts)
B: 0,6 µmole NADH (50% des Pyridinnucleotid-Gehalts)
C: 0,8 µmole NADH (57% des Pyridinnucleotid-Gehalts)

Anlaufphase, weil die Hydrogenase in der aktiven Form vorliegt; damit steigt aber auch die Konzentration des Reaktionsproduktes schneller an. Die Hemmung des Enzyms wirkt sich früher und stärker aus. Die ohne Präinkubation am Ende der Anlaufphase erzielte Maximalgeschwindigkeit kann somit nicht erreicht werden.

Dagegen verläuft bei der mit Pyruvat-Lactatdehydrogenase oder Phenazinmethosulfat gekoppelten manometrischen Bestimmung der Hydrogenaseaktivität die Wasserstoffaufnahme nach Einstellung eines Gleichgewichts linear (Abb.16 u. 17), weil alle Hydrogenasemoleküle in der aktivierten Form vorliegen und bei einem gleichbleibenden Redoxverhältnis der Pyridinnucleotide reagieren.

4. Die regulative Funktion der löslichen Hydrogenase.

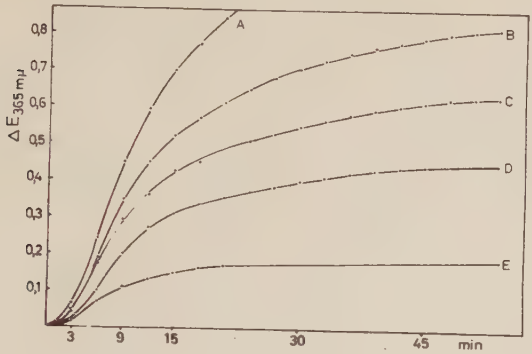
Eine Reihe von Enzymen, die eine Schlüsselstellung bei der Ausnutzung bestimmter Stoffwechselwege einnehmen, werden durch Intermediärprodukte derart modifiziert, daß ihnen neben der katalytischen eine stoffwechselregulierende Funktion zukommt (ATKINSON 1965). Die regulatorisch wirksamen Metabolite werden Effektoren genannt. Sie verändern die Affinitäten der Enzyme zu ihren Substraten. Allosterisch nennt man solche Enzyme, deren Aktivität durch Wechselwirkung zwischen Protein und Effektor in einer von der kompetitiven Hemmung durch ein Substratanaloges zu unterscheidenden Weise verändert werden (MONOD u. JAKOB 1961).

Als wasserstoffaktivierende Enzyme nehmen die Hydrogenasen eine zentrale Stellung im Stoffwechsel autotroph wachsender Knallgasbakterien ein. Die beschriebenen Versuche über das kinetische Verhalten der löslichen Hydrogenase aus Hydrogenomonas H 16 haben gezeigt, daß die Aktivität dieses Enzyms durch die Konzentration seines Reaktionsproduktes NADH beeinflußt wird. Diesem

Befund kommt unter Berücksichtigung der bei der Bestimmung der intrazellulären Redoxverhältnisse des Nicotinamid-adenin-dinucleotids während der Speicherstoffsynthese und der Leerlaufreaktion erhaltenen Ergebnisse und im Zusammenhang mit der Beschleunigung der Wasserstoffaufnahme ganzer Zellen bei der Fixierung von CO_2 eine regulatorische Bedeutung zu.
Wird die Hydrogenasereaktion in Thunbergküvetten mit gleichen Mengen an löslicher Fraktion aber verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt, ergeben sich zeitliche Reaktionsabläufe (Abb.28), die mit der Hypothese einer Enzymaktivierung durch geringe Mengen an NADH und einer allosterischen Hemmung (negativer Effektor) durch höhere NADH-Konzentrationen im Einklang stehen.

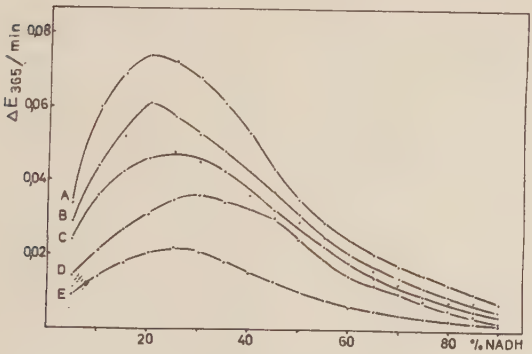
In Abb.29 sind die Werte der gleichen Bestimmungsreihe als Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des jeweiligen, im Ansatz befindlichen Prozentgehalts an reduziertem Pyridinnucleotid dargestellt. Hieraus geht hervor, daß die Geschwindigkeit der Hydrogenasereaktion von der Konzentration des Substrats und vom Redoxverhältnis des Pyridinnucleotids abhängt. Wegen der zunächst erfolgenden Aktivierung der Hydrogenase steigt die Reaktionsgeschwindigkeit am Anfang an, durchläuft, nachdem 20 - 30 % des NAD reduziert ist, ein Maximum und nimmt danach stark ab. Vermutlich ist die beobachtete Anlaufphase in vivo von untergeordneter Bedeutung, denn es ist anzunehmen, daß die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit unter den stationären Bedingungen, wie sie in der Zelle vorliegen, schneller erfolgt, weil sich eine größere Anzahl von Enzymmolekülen in der reaktionsfähigen Form befindet.

Abb. 28 Zeitlicher Verlauf der NAD-Reduktion mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen



Wie in Abb. 27 mit 3,13 mg Protein der löslichen Fraktion
A: 1,6 umole NAD B: 1,2 umole NAD C: 0,8 umole NAD
D: 0,4 umole NAD E: 0,2 umole NAD

Abb. 29 Geschwindigkeit der NAD-Reduktion bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen in Abhängigkeit des Redox-verhältnisses der Pyridinnucleotide (Werte der Abb. 28)



Ruhende Zellen von Hydrogenomonas H 16 oxydieren Wasserstoff unter Speicherbedingungen in Gegenwart von CO_2 viermal so schnell wie unter Leerlaufbedingungen ohne CO_2. Die Bestimmungen der intrazellulären Redoxverhältnisse der Pyridinnucleotide ergaben, daß in Gegenwart von CO_2 ungefähr 35 % und in Abwesenheit von CO_2 55 % des Nicotinamid-adenin-dinucleotids in reduzierter Form vorliegt. Aus Abb. 29 ist zu entnehmen, daß sich die Geschwindigkeiten der Hydrogenasereaktion bei diesen Redoxverhältnissen um den Faktor 2 unterscheiden. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Unterschiede in den Redoxverhältnissen der freien Pyridinnucleotide noch erheblich größer als die experimentell bestimmten Werte sind. Damit ergibt sich auch ein größerer Unterschied in der durch das Redoxverhältnis beeinflußten Hydrogenaseaktivität.

Diskussion

A. Elektronentransport

Die mit Hilfe von Ultraschall hergestellten Extrakte aus autotroph gewachsenen Zellen von Hydrogenomonas H 16 konnten durch differentielle Zentrifugation in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion aufgetrennt werden. Beide verfügen über funktionsfähige Elektronentransportketten, die die Oxydation von Wasserstoff katalysieren.

Aus der durch die Differenzspektren ersichtlichen Verteilung der Flavoproteine und Cytochrome, aus der Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die durch die Fraktionen katalysierte Knallgasreaktion und aus dem Nachweis, daß eine Cytochromoxydase nur in der Partikelfraktion und nicht in der löslichen Fraktion auftritt, wurde der Schluß gezogen, daß bei Hydrogenomonas H 16 vollständige, mit der oxydativen Phosphorylierung gekoppelte Atmungsketten in der Partikelfraktion lokalisiert sind und daß die durch die lösliche Fraktion katalysierte Wasserstoffoxydation durch einen Nebenweg über eine verkürzte Atmungskette erfolgt.
Während die Atmungsketten von Zellen höherer Organismen in der Mitochondrionmembran lokalisiert sind, finden sich die meisten Elektronenüberträger und Enzyme der Atmungsketten von Bakterien in den nach Aufschluß der Zellen durch fraktionierte Zentrifugation erhaltenen submikroskopischen Partikeln (MARR 1960). Ähnlich geschädigten Mitochondrien besitzen diese bakteriellen Systeme keine Atmungskontrolle und nur eine verminderte Phosphorylierungsfähigkeit. Wie zonenelektrophoretische und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, setzen sich die Partikelfraktionen von Bakterienextrakten aus RNS-reichen, für die Proteinsynthese verantwortlichen Ribosomen und phospholipidreichen, Elektronentransport-

ketten enthaltenden Bruchstücken der Cytoplamamembran zusammen (WEIBULL 1953; SMITH 1961).
Über die Zusammensetzung der Atmungsketten von Knallgasbakterien liegen bisher kaum Untersuchungen vor. PACKER (1958) wies in intakten Zellen von Hydrogenomonas ruhlandii Cytochrome des b- und c-Typs nach. BONE (1963) fand bei Pseudomonas saccharophila eine ähnliche Verteilung der Flavoproteine und Cytochrome wie sie in dieser Arbeit für Hydrogenomonas H 16 beschrieben wurden.

Untersuchungen über die den Elektronentransport in den Atmungsketten katalysierenden Enzyme stoßen auf besondere Schwierigkeiten. Die Atmungskette ist als Multienzymsystem selbst Teil der Mitochondrion- bzw. Cytoplasmamembran. Die Geschwindigkeit, mit der verschiedene Substrate und Coenzyme, die Membran passieren und an den Ort ihrer spezifischen Enzyme gelangen, sind sehr verschieden. Während zum Beispiel aus Untersuchungen über die Verteilung der Komponenten des Adenylatsystems hervorgeht, daß AMP, ADP und ATP innerhalb der Zelle frei beweglich sind, zeigen verschiedene Konzentrationen der oxydierten und reduzierten Pyridinnucleotide im Cytoplasma und in den Partikeln, daß diese Coenzyme die Membran nicht zu durchdringen vermögen (SANTARIUS u. HEBER 1965). Die Unbeeinflußbarkeit der Knallgasreaktion in den Partikeln durch zugesetztes NADH, FMN und Cytochrom c läßt vermuten, daß der Elektronentransport von intakten Membransystemen katalysiert wird. Aus diesem Grunde ist es auch verständlich, daß mit Ausnahme der Menadionreductase bei allen Enzymen, die NADH als Substrat benötigen, in den gewaschenen Partikeln nur geringe Aktivitäten gefunden wurden.
Unter autotrophen Bedingungen beginnt der durch die Partikeln katalysierte Elektronentransport mit einer Aktivierung des Wasserstoffs durch eine unlösliche Hydro-

genase. Partikelgebundene Hydrogenasen wurden bei verschiedenen aeroben und anaeroben Mikroorganismen nachgewiesen (EBERHARDT 1965). Die Aktivität dieser Enzyme konnte nur durch die Reduktion künstlicher Elektronenakzeptoren bestimmt werden. Die Ursache für das Unvermögen aller partikelgebundenen Hydrogenasen NAD zu reduzieren, liegt wahrscheinlich an der Impermeabilität für Pyridinnucleotide.
Auch das durch Einwirkung von Dimercaptopropanol oder durch Inkubation bei pH 11 von den Partikeln gelöste Enzym war nicht in der Lage, NAD zu reduzieren. Bei den in hochorganisierter Form in den Partikeln oder Membranen vorliegenden Enzymen der Atmungskette ist bei der Loslösung der Enzyme von den Partikeln die Möglichkeit einer Artefaktbildung besonders groß. Wie die solubilisierte Hydrogenase aus Hydrogenomonas H 16 ist auch die Succinat-Dehydrogenase mitochondrialer Systeme in Lösung sehr instabil (KIMURA, HAUBER u. SINGER 1963). Bei einer von Mitochondrien gelösten NADH-Dehydrogenase trat ein Zerfall in Untereinheiten mit NADH-Cytochrom c-Reductase-und Diaphorase-Aktivität auf (CREMONA, KEARNEY, VILLAVICENCIO u. SINGER 1963).
Man kann daher aus der Unfähigkeit der gelösten partikulären Hydrogenase, NAD zu reduzieren, keine Rückschlüsse auf ihr Verhalten in vivo ziehen. Die Beobachtung, daß zur Methylenblaureduktion katalytische Mengen an NAD erforderlich sind (VISHNIAC u. TRUDINGER 1962; BERNSTEIN u. VISHNIAC 1959; PACKER u. VISHNIAC 1955) und die Ansicht, daß die mit der Reduktion von Methylenblau gekoppelten Dehydrogenase-Reaktionen über Flavoproteine verlaufen, machen es vielmehr wahrscheinlich, daß in intakten Zellen und isolierten Partikeln bei der Knallgasreaktion der Wasserstoff auf intrapartikuläres NAD der Atmungsketten übertragen wird.

Die relativ hohen Menadionreductase-Aktivitäten in der löslichen und partikulären Fraktion der zellfreien Extrakte von Hydrogenomonas H 16 deuten auf eine Beteiligung von Chinonen am Elektronentransport hin. Lipochinone spielen bei der Atmung und oxydativen Phosphorylierung in mitochondrialen Systemen eine wichtige Rolle (GREEN u. FLEISCHER 1963) und wurden bei vielen Bakterien nachgewiesen, die eine Cytochromoxydase besitzen (COOK u. UMBREIT 1963). Während zum Beispiel in den Elektronentransportsystemen von Mycobacterium phlei, Haemophilus parainfluenzae und Bacillus subtilis Vitamin K-Derivate auftreten, wurden bei Escherichia coli und Proteus vulgaris Vitamin K und Coenzym Q und bei Azotobacter vinelandii und Thiobacillus oxydans nur Coenzym Q nachgewiesen (BRAGG 1965; REBEL u. MANDEL 1965; KASHKET u. BRODIE 1962).

Die Empfindlichkeit der Chinone gegenüber UV-Licht erlaubt ihre selektive Zerstörung ohne Schädigung anderer Cofaktoren oder der strukturellen Integrität. Elektronentransport und oxydative Phosphorylierung lassen sich nach der Bestrahlung durch Zugabe der natürlichen Chinone oder Menadion mit Malat oder anderen mit der Reduktion von NAD verbundenen Substraten wiederherstellen (TANIGUCHI u. KAMEN 1965; BRODIE 1961; BRODIE u. RUSSEL 1963; DOWNEY 1964; KASHKET u. BRODIE 1963; SCHOLES u. KING 1965).

Da Menadion die Wasserstoffoxydation in der löslichen und Partikelfraktion von Hydrogenomonas H 16 auch vor dem Bestrahlen mit UV-Licht erhöht, kann man aus diesen Versuchen nicht direkt schließen, ob Chinone am Elektronentransport der Knallgasreaktion beteiligt sind. Ähnliche Verhältnisse wurden bei der Stimulierung der NADH-Oxydation mit Menadion in Rohextraken aus Mycoplasma hominis beobachtet (VAN DEMARK u. SMITH 1964). Wegen der hohen Menadionreductase-Aktivität und weil Coenzym Q auch bei Hydrogenomonas eutropha nachgewiesen wurde

(LESTER u. CRANE 1959), ist es jedoch wahrscheinlich, daß natürliche Chinone auch Bestandteile des Elektronentransportsystems von Hydrogenomonas H 16 sind.
Außer molekularem Wasserstoff wird von den Partikeln als einziges Substrat noch Succinat veratmet. Die Partikeln ähneln in dieser Hinsicht denen, die aus Mycobacterium phlei isoliert wurden (BRODIE u. ADELSON 1965).
Eine Menadionreductase-Aktivität wurde in Extrakten verschiedener Bakterien nachgewiesen. Die bei Hydrogenomonas gefundene Verteilung des Enzyms gleicht der bei Mycobacterium phlei (BRODIE 1961), E. coli (KASHKET u. BRODIE 1963) und Hydrogenomonas eutropha (REPASKE u. LIZOTTE 1965). Es handelt sich hierbei um ein nach dem Aufbrechen der Zellen und fraktionierter Zentrifugation größtenteils im Überstehenden befindliches, an kleine Partikeln assoziiertes Enzym, dessen physiologischer Elektronenakzeptor wahrscheinlich Vitamin K ist (BRAGG 1965). Nach neueren Untersuchungen von ASANO u. BRODIE (1965) sind bei Mycobacterium phlei in der Hauptsache drei verschiedene, mit der oxydativen Phosphorylierung gekoppelte Atmungsketten vorhanden. Ähnlich wie in den Mitochondrien existiert ein Elektronentransportweg, der von der Dehydrierung des Succinat und ein anderer, der von der Dehydrierung von solchen Substraten ausgeht, die mit der Reduktion von NAD verknüpft sind. Während diese Atmungsketten vollständig in den Partikeln lokalisiert sind, erfolgt die Oxydation von Malat neben der Übertragung des Wasserstoffs auf NAD noch auf einem zweiten Weg über eine Malat: Vitamin K-Reductase. Hierdurch wird eine dritte Atmungskette gebildet, deren Anfangssequenz sich in der löslichen Fraktion befindet.
Unter autotrophen Wachstumsbedingungen besteht bei Hydrogenomonas H 16 wahrscheinlich keine Notwendigkeit zur Versorgung der partikulären Atmungsketten mit dem Wasserstoff des durch die lösliche Hydrogenase gebildeten

extrapartikulären NADH. Die partikelgebundene Hydrogenase kann die Atmungskette in ausreichendem Maße mit Wasserstoff versorgen. Das durch die lösliche Hydrogenase gebildete freie, im Cytoplasma befindliche NADH wird für die CO_2-Fixierung benötigt.

Da außer molekularem Wasserstoff von gewaschenen Partikeln lediglich Succinat oxydiert wird, müssen die Zellen für das Wachstum auf anderen organischen Substraten über einen Mechanismus verfügen, der es ihnen erlaubt, den Wasserstoff des durch lösliche Hydrogenasen gewonnenen extrapartikulären NADH auf die partikuläre Atmungskette zu übertragen.
In Mitochondrien sind derartige Transportmechanismen durch multiple Formen eines Enzyms mit unterschiedlichen Substrataffinitäten, elektrophoretischen und chromatographischen Verhalten verwirklicht. Es wurden zwei Malatdehydrogenasen und zwei α-Glycerophosphat-Dehydrogenasen nachgewiesen. Während die eine Form des Enzyms im Cytoplasma gelöst ist und den Wasserstoff von dem durch die dem Wachstumsubstrat spezifische Dehydrase gebildeten NADH auf Oxalacetat bzw. Dihydroxyacetonphosphat überträgt, befindet sich die andere Enzymform in der Mitochondrionmembran und katalysiert die Reoxydation von Malat bzw. α-Glycerophosphat unter Übertragung des Wasserstoffs auf die Atmungskette (KAPLAN 1963).

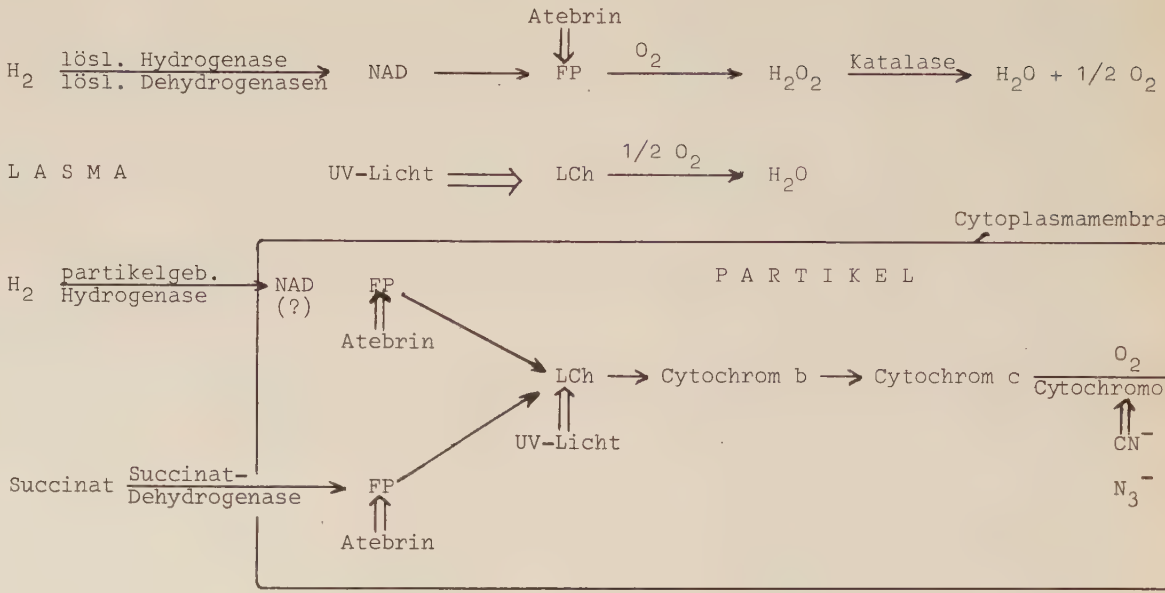
Gleiche und ähnliche Transportmechanismen sind auch für bakterielle Systeme in Erwägung gezogen worden. Bei Pseudomonas fluorescens wurde eine Pyridinnucleotid-Transhydrogenase isoliert, die den Wasserstoff von NADPH auf NAD überträgt (COLOWICK et al. 1952), und bei Azotobacter wurden zwei Malat-Dehydrogenasen gefunden, die diese Transportfunktion übernehmen könnten (JONES u. REDFEARN 1966). Nach den Untersuchungen über die intrazellulären Pyridinnucleotid-Konzentration scheint die

Bildung von NADPHjedoch im Stoffwechsel von Hydrogenomonas H 16 von geringer Bedeutung zu sein. Die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase erwies sich ebenfalls als NAD-spezifisch (GOTTSCHALK 1963). Die als Vermittler der Reduktionsäquivalente zwischen Cytoplasma und Partikel in Frage kommenden Substrate Malat, α-Glycerophosphat, Lactat und ß-Hydroxybutyrat werden von den aus Hydrogenomonas H 16 isolierten Partikeln weder mit Sauerstoff noch mit Methylenblau oxydiert. Da die in relativ hoher Konzentration in der löslichen und partikulären Fraktion vorhandene Menadionreductase NADH reoxydiert, kann sie in Verbindung mit natürlichen Chinonen als Überträger von Wasserstoff zwischen dem löslichen und dem partikulären System von Bedeutung sein.
Aus den Untersuchungen über die Verteilung der Enzyme und Überträger der Atmungskette bei Hydrogenomonas H 16 geht hervor, daß die durch die lösliche Fraktion katalysierte Knallgasreaktion über eine verkürzte Atmungskette erfolgt, an der Cytochrom b und Cytochromoxydase nicht beteiligt sind. Da die Wasserstoffoxydation jedoch sowohl in der Partikelfraktion als auch in der löslichen Fraktion durch Atebrin gehemmt wird, ist anzunehmen, daß das durch die lösliche Hydrogenase gebildete NADH durch ein Flavoprotein reoxydiert wird. Verkürzte Atmungsketten, die mit einem Flavin enden, sind besonders bei den mikroaerophilen Milchsäurebakterien und anderen fakultativ aeroben Mikroorganismen bekannt (van DEMARK u. SMITH 1964). Bei der enzymatischen Oxydation des reduzierten Flavoproteins mit molekularem Sauerstoff entsteht Wasserstoffperoxyd, das durch eine in der löslichen Fraktion nachzuweisende Katalase leicht zersetzt werden kann.
Da die Wasserstoffoxydation auch in der löslichen Fraktion durch Bestrahlung bei 360 mμ gehemmt wird, muß man annehmen, daß am Elektronentransport in irgendeiner

Weise ein Lipochinon oder ein anderer UV-empfindlicher Faktor beteiligt ist.
Die in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten Ergebnisse über die Zusammensetzung des Elektronentransportsystems sind schematisch in Abb.30 zusammengefaßt und geben einen Überblick über die im Cytoplasma und in den Partikeln autotropher Zellen von Hydrogenomonas H 16 wirksamen Elektronentransportketten.

In zellfreien Extrakten von Hydrogenomonas H 16 konnte weder Ferredoxin noch ein anderer niedermolekularer Faktor nachgewiesen werden, der für die durch die lösliche Hydrogenase katalysierte NAD-Reduktion erforderlich ist.
Nach der Entdeckung des Ferredoxin (MORTENSEN, VALENTINE u. CARNAHAN 1962) und nach Erkennen seiner Schlüsselposition als Elektronenkoppler zwischen einer Reihe von Dehydrogenasen und Hydrogenasen (TAGAWA u. ARNON 1962) wurde die Ansicht vertreten, daß Ferredoxin auf Grund seines ungewöhnlich negativen, der Wasserstoffelektrode entsprechenden Redoxpotentials in allen Organismen vorhanden ist, die gasförmigen Wasserstoff umsetzen (KARLSON 1966). Die Anschauung mußte später revidiert werden. Die Reaktionen mit Ferredoxin setzen vielmehr sowohl hinsichtlich der beteiligten Dehydrogenasen als auch hinsichtlich der Hydrogenasen eine Spezifität voraus. So reagieren z.B. verschiedene Hydrogenasen und eine Formiat-Dehydrogenase aus Cl.pasteurianum (VALENTINE u. WOLF 1963) nicht mit Ferredoxin, obwohl dieser Redoxkatalysator in Cl.pasteurianum enthalten ist.
Ferredoxin ist in anaeroben Mikroorganismen an der Pyruvatoxydation durch die phosphoroklastische Reaktion, an der Wasserstoffentwicklung aus Dithionit und an der Stickstoff-Fixierung (VALENTINE u. WOLF 1963; MORTENSEN 1963; MORTENSEN, VALENTINE u. CARNAHAN 1963) und in

Abb. 30 Elektronentransportsystem autotropher Zellen von Hydrogenomonas H 16



Abkürzungen:
LCH : Lipochinon
FP : Flavoprotein

photosynthetisierenden Bakterien, Algen und grüren Pflanzen am Elektronentransport in den Chloroplasten beteiligt (TAGAWA u. ARNON 1962). Es wurde aber bisher nie in aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen gefunden (BUCHANAN, LOVENBERG u. RABINOWITZ 1963; BUCHANAN u. RABINOWITZ 1964).
Auf Grund physikochemischer Untersuchungen wurde für das aktive Zentrum des Ferredoxins ein Modell entwickelt, bei dem sieben Eisenatome in einer linearen Anordnung über Schwefelbrücken verbunden sind, die von sieben Cysteinresten des Proteins und sieben anorganischen Sulfiden gebildet werden. Die Abstände zwischen den Eisenatomen erlauben eine starke kovalente Wechselwirkung, die einen Elektronentransport durch die Kette gestatten (BLOMSTROM, KNIGHT, PHILLIPS u. WEIHER 1964). Bei der aus Spinatblättern (SAN PIETRO u. LANG 1956) und aus Chloroplastenextrakten (ARNON, WHATLEY u. ALLEN 1957) isolierten "photosynthetic pyridine nucleotide reductase", die heute von einigen Autoren auch zur Familie der Ferredoxine gezählt wird (TAGAWA u. ARNON 1962), handelt es sich um ein Protein mit nur 2 labilen Sulfidgruppen und zwei Eisenatomen.
Schließlich konnten aus Anacystis nidulans zwei gelbgefärbte Proteine mit Ferredoxinaktivität (SMILLIE 1965) und aus Zellen von Cl.pasteurianum, die unter Eisenmangelbedingungen gewachsen waren, ein wegen seiner Ferredoxinaktivität Flavodoxin genanntes Flavoprotein isoliert werden (KNIGHT Jr., D'EUSTACHIO u. HARDY 1966).
Wenn eine Funktion des Ferredoxins darin besteht, die Differenz zwischen den Redoxpotentialen des Pyridinnucleotidsystems und der Wasserstoffelektrode zu überbrücken, dann weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß hierzu auch molekulare Anordnungen aus wenigen Thiolgruppen und Eisenatome in der Lage sind. Untersuchungen über die Hydrogenase aus Pseudomonas saccharophila und

aus Hydrogenomonas ruhlandii (BONE 1963) führten zu der Vermutung, daß diese Enzyme über Thiolgruppen mit dem Protein verbundenes Eisen enthalten. Der Vergleich im kinetischen Verhalten der löslichen Hydrogenasen aus Hydrogenomonas H 16 und Hydrogenomonas ruhlandii zeigte, daß beide Enzyme sehr ähnlich sind. Auch die Hydrogenase aus Hydrogenomonas H 16, deren Aktivität durch Fe^{2+}-Ionen stimuliert wird, ist ein eisenhaltiges Enzym (LINKE, pers.Mitt.).

Damit ist es möglich, daß diese Enzyme in ihrer Proteinstruktur selbst die für die Ferredoxinaktivität charakteristische Anordnung enthalten und eines zusätzlichen Faktors gar nicht bedürfen.

B. Regulatorische Kontrollmechanismen

Die Biosynthesen der für den Aufbau der Zellbestandteile wichtigen Intermediärprodukte werden vielfach durch "feedback"-Kontrollmechanismen reguliert. Darunter versteht man die spezifische Wirkung eines Syntheseproduktes auf ein Enzym, das einen früheren Schritt der zu diesem Produkt führenden Biosynthesekette katalysiert. UMBARGER (1956) zeigte, daß in Zellextrakten die Threonin-Dehydrogenase - das erste gemeinsame Enzym bei der Biosynthese von Threonin und Isoleucin - durch Isoleucin gehemmt wird. YATES und PARDEE (1956) entdeckten eine Feedback-Produkthemmung bei der Biosynthese der Pyrimidine.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung über die Beziehungen zwischen der Geschwindigkeit der Wasserstoffoxydation, dem Adenylatsystem und dem Redoxverhältnis der Pyridinnucleotide mit intakten Zellen von Hydrogenomonas H 16 zeigte, daß die in Anwesenheit von CO_2 erhöhte Wasserstoffaufnahme von einer Erniedrigung des ATP-Spiegels und des Redoxpotentials der Pyridinnucleotide begleitet wird. Diese Veränderungen sind mit einem erhöhten Verbrauch an Energie in Form von ATP und an Reduktionsmittel in Form von NADH für die Fixierung des Kohlendioxyds und für die Synthese des Speicherstoffs PHBS zu erklären.
Für die Regulierung des Energiestoffwechsels, d.h. der Anpassung der energieproduzierenden an die energieverbrauchenden Prozesse des Stoffwechsels, sind die Komponenten des Adenylatsystems und die Redoxverhältnisse der Pyridinnucleotide von großer Bedeutung.
So wurde bei Azotobacter vinelandii eine Abhängigkeit der Wasserstoff-Entwicklung und der Stickstoff-Fixierung von der ATP-Konzentration beobachtet (BURNS u. BULLEN 1965). Charakteristische Konzentrationsänderungen der

Adenylate und Pyridinnucleotide während der Lichtphosphorylierung bei Chlorella (KANDLER u. HABERER-LIESENKÖTTER 1963) und in aeroben und anaeroben Hefekulturen (MIZUSHIMA, MACHIDA u. KITAHARA 1963; HOLZER 1958) zeigten, daß die Glykolyse durch die Phosphorylierung reguliert wird.

In Bakterienzellen variieren die Konzentrationsverhältnisse von AMP, ADP und ATP in weitem Maße (STANGE, WADE u. DARCK 1963). Infolge der Phosphorylierungsreaktionen und der Wirkung der Myokinase stehen die Konzentrationen von AMP und ADP in einem reversiblen Verhältnis zur ATP-Konzentration. Ein Zusammenhang zwischen dem Energiehaushalt der Zellen und den stoffwechselregulierenden Eigenschaften der Adenylate gibt sich auch dadurch zu erkennen, daß in vielen Fällen der Einfluß von AMP oder ADP auf die Enzymaktivität der Wirkung von ATP entgegengerichtet ist und daß in einigen Fällen bei gleichen Enzymen aus verschiedenen Organismen die Effektorwirkung von AMP durch ADP ersetzt ist.

Bei der Phosphofructokinase wirkt allgemein AMP, nur bei E.coli ADP, als positiver und ATP als negativer Effektor (RAMAIAH, HATHAWAY u. ATKINSON 1964; WALTON u. ATKINSON 1966). Die NAD-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase wird ebenfalls durch AMP, in tierischen Zellen durch ADP, stimuliert (HATHAWAY u. ATKINSON 1963; GOEBEL u. KLINGENBERG 1964). Bei der Citratsynthetase wurde eine Hemmung durch ATP festgestellt (HATHAWAY u. ATKINSON 1965). Mit der Regulation dieser drei Enzyme durch die intrazellulären Verhältnisse von AMP und ADP zu ATP sind die Zellen in der Lage, den Abbau der Kohlenhydrate dem Bedarf an ATP anzupassen.

Die AMP-Hemmungen der Fructose-1,6-diphosphatase aus Candida utilis (ROSEN, ROSEN u. HORECKER 1965) und der Adenosin-5'-phosphosulfat-Reductase aus Desulfovibrio desulfuricans (PECK Jr. u. DAVIDSON 1966) liefern weitere

Beispiele für Kontrollmechanismen, bei denen eine Komponente des Energiestoffwechsels die Biosynthese von Hexosen und Pentosen bzw. die Sulfatatmung eines Bakteriums reguliert.
Daß neben den Adenylaten auch die Redoxverhältnisse der Pyridinnucleotide für die Regulation des Energiestoffwechsels von Wichtigkeit sind, zeigt die Beobachtung von BOSE u. GEST (1963), daß für eine maximale Kopplung zwischen dem lichtaktivierten Elektronentransport und den Phosphorylierungsreaktionen ein optimales Redoxpotential erforderlich ist.
Von grundlegender Bedeutung für die Regulation des Stoffwechsels autotropher Bakterien während der Energie und Reduktionspotential verbrauchenden Prozesse der CO_2-Fixierung sind die Untersuchungen von JOHNSON u. PECK (1965) über die Hemmung der CO_2-Fixierung durch AMP in zellfreien Extrakten von Thiobacillus thioparus und von McFADDEN u. CHANG-CHU L.TU (1965), die auch in zellfreien Extrakten von Hydrogenomonas facilis eine Unterdrückung der CO_2-Fixierung durch AMP und eine Stimulierung mit NADH und ATP beobachteten. Wenn 65 bis 70 % der Adenosinnucleotide in Form von AMP vorliegen, wird das CO_2-fixierende System vollständig gehemmt. Dieser Kontrollmechanismus erlaubt den Organismen eine bestimmte, kritische intrazelluläre ATP-Konzentration für andere lebensnotwendige, energieverbrauchende Reaktionen aufrechtzuerhalten.
Die Geschwindigkeit des Elektronentransports in Mitochondrien wird durch die Menge des verfügbaren ADP und anorganischen Phosphats bestimmt. Wenn auch in Bakterien eine derartige direkte Atmungskontrolle nicht nachzuweisen ist (WHITE, HANDLER u. SMITH 1964), so zeigen doch die angeführten Beispiele, daß auch Bakterienzellen über Kontrollmechanismen verfügen, mit deren Hilfe sie

die unter Energiegewinn und unter Energieverbrauch ablaufenden Prozesse der jeweiligen intrazellulären ATP-Konzentration anpassen.
Die in dieser Arbeit beschriebene kinetische Untersuchung über das Verhalten der löslichen Hydrogenase ergab, daß die Aktivität dieses Enzyms infolge einer Produkthemmung durch NADH einer regulatorischen Kontrolle unterworfen ist. Zusammen mit den Bestimmungen der intrazellulären Konzentrationen von reduziertem und oxydiertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid erklären sie wenigstens zum Teil die Unterschiede in der Wasserstoffaufnahme ruhender Zellen von Hydrogenomonas H 16 unter Knallgas in An- und Abwesenheit von CO_2.
Der Kontrollmechanismus der Hydrogenase gleicht formal dem der bereits zitierten Adenosinphosphosulfat-Reductase (PECK u. DAVIDSON 1966). Beide Enzyme werden durch ihre Reaktionsprodukte NADH bzw. AMP gehemmt. Während die Reductase die Sulfatatmung von Desulfovibrio desulfuricans kontrolliert, reguliert die lösliche Hydrogenase die Menge des für Reduktionen zur Verfügung stehenden NADH.
Bei Hydrogenomonas H 16 wird Wasserstoff sowohl durch die lösliche als auch die partikuläre Hydrogenase verwertet. Mit Wasserstoff als begrenzendem Faktor könnte durch die Produkthemmung der löslichen Hydrogenase eine sinnvolle Verteilung des Substrats auf beide Hydrogenasen gewährleistet werden. Die Bildung der für die CO_2-Fixierung wichtigen Verbindungen NADH und ATP, die einerseits in Cytoplasma andererseits jedoch in den Partikeln erfolgt, wäre somit aufeinander abgestimmt.

Methoden

A. Zellmaterial zur Herstellung zellfreier Extrakte

1. Anzucht von Hydrogenomonas

Zellen von Hydrogenomonas H 16 (WILDE 1961), Hydrogenomonas ruhlandii V-8-N (PACKER u. VISHNIAC 1955) und Hydrogenomonas facilis P (SCHATZ u. BOVELL 1952) wurden unter chemolithotrophen Bedingungen in einer Nährlösung folgender Zusammensetzung herangezogen:

a)	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	9,0 g
	KH_2PO_4	1,5 g
	H_2O	600 ml
b)	NH_4Cl	1,0 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	10 mg
	Fe(NH_4)-citrat	1,2 mg
	H_2O	300 ml
c)	Hoagland'sche Spurenelementlösung	2 ml
d)	$NaHCO_3$	0,5 g
	H_2O	100 ml

Für Agarkulturen wurde 20 % Difco-Agar zugesetzt.
Nach getrennter Sterilisierung wurden die Lösungen zusammengegeben und mit einer 24 Stunden gewachsenen Vorkultur beimpft. Chemolithotrophes Wachstum erfolgte unter einer Gasatmosphäre von 70 % H_2, 20 % O_2 und 10 % CO_2. Bei heterotrophem Wachstum wurde Lösung d) durch eine 5 %ige Lösung des entsprechenden Substrats ersetzt und unter Luft inkubiert. Die Anzucht von Kulturen bis zu 50 ml erfolgte auf einer Schüttelmaschine in Erlenmeyerkolben, die unter autotrophen Bedingungen in Witt'schen Töpfen begast wurden. Größere Kulturen wurden mit 1 oder 3 Liter Nährlösung in 2- bzw. 5-Liter-Zweihalskolben bei 28° unter magnetischer Rührung herangezogen (SCHLEGEL, KALTWASSER, GOTTSCHALK 1961).

2. Anzucht von Escherichia coli

Zellen von E. coli wurden in 6-Liter-Zweihalskolben bei 28° mit einer aus 8 g Nutrient Broth (Difco) und 5 g NaCl pro Liter bestehenden Nährlösung herangezogen.

3. Anzucht von Clostridium pasteurianum

Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung (CARNAHAN u. CASTLE 1958):

a)	Saccharose	20 g
	H_2O	400 ml
b)	K_2HPO_4	0,5 g
	KH_2PO_4	0,5 g
	H_2O	300 ml
c)	$MgSO_4 \cdot H_2O$	0,1 g
	NaCl	0,1 g
	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,01 g
	$CaCO_3$	10,0 g
	Biotin	1 ug
	p-Aminibenzoesäure	1 ug
	H_2O	300 ml

Die drei Lösungen wurden getrennt sterilisiert und nach dem Abkühlen durch Sterilfiltration mit einer Lösung von 10 mg $FeSO_4$ in 1 ml Wasser versetzt.
Die Gewinnung des Zellmaterials erfolgte in einer mit 3 %iger Formalinlösung und sterilem Wasser desinfizierten Weinflasche von 32 Liter Inhalt, die mit 29 Liter Nährlösung gefüllt, mit 3 Liter einer 4 Tage gewachsenen Vorkultur beimpft und mit einem mit Wasser beschickten Gärröhrchen versehen, anaerob bei 28° inkubiert wurde. Einer gelegentlich auftretenden Schaumbildung begegnete man durch Zusatz von Siliconentschäumer. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 80-stündigem Wachstum durch Zentrifugation mit einer Cepa Schnellzentrifuge.

Die für diesen Ansatz benötigte 3 Liter Vorkultur entstand in drei Stufen über Ansätze in 5 ml difco Bacto AC-Medium, das mit den Zellen einer Schrägagarkultur beimpft wurde, und 200 ml Nährlösung. Die Ansätze wurden in einem mit in 20 %igem Pyrogallol und gesättigter Sodalösung getränkter Watte ausgelegten Witt'schen Topf unter 0,8 Atmosphären Stickstoff inkubiert.
Die Zellen von Hydrogenomonas und E. coli wurden am Ende der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation gesammelt (Christ-Junior 3, 5000 U/min., 20 Min.) und zweimal mit 0,066 M Phosphatpuffer, pH 7,0 gewaschen.

4. Trockengewichtsbestimmung: 50 oder 100 ml der Bakteriensuspension wurden 20 Min. bei 5000 U/min. zentrifugiert, zweimal mit dest.Wasser gewaschen und das mit wenig Wasser aufgenommene Zentrifugat bei 85° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

5. Proteinbestimmung ganzer Zellen: Die Proteinbestimmung in ganzen Zellen erfolgte nach der Biuret-Methode von LA RIVIERE (1958).

B. Herstellung zellfreier Extrakte

1. Gewinnung von Rohextrakten

Die Bakterienzellen wurden nach folgenden Methoden aufgeschlossen:

a) Ultraschall (n. HÜBENER 1959): 1-2 ml gepackte Zellen wurden mit 0,066 M Phosphatpuffer, pH 7,0 auf 5 ml verdünnt und mit einem Ultraschallgerät der Firma Schoeller u. Co., Frankfurt a.M. bei Temperaturen zwischen 0-5° in Intervallen von 20 Sekunden 5 Minuten lang beschallt (20600 Ws/ml). Die Kühlung erfolgte mit Alkohol von -6° aus dem Ultra-Kryomaten TK 30 D (Meßgerätewerk Lauda).

b) Hydraulische Zertrümmerung (n. HUGHES 1951): Die gewaschenen Zellen wurden in wenig Phosphatpuffer (0,066 M, pH 7,0) aufgenommen, die Suspension in eine Hughes-Presse (Schandon Scientific Co., London) bei -30 bis -40° eingefroren und hydraulisch aufgeschlossen.

c) Zerreiben mit Alcoa-A-303 (n. McILWAIN 1948): Die in einem Porzellanmörser eingefrorene Zellmasse wurde bei 4° mit 2 - 3 Gewichtsteilen Alumina 15 Min. unter langsamer Zugabe der gleichen Menge Phosphatpuffer zerrieben.

Die nach einem dieser Verfahren aufgeschlossenen Zellen wurden durch 20 min. Zentrifugieren bei 10000 g und 2° von den Zellrückständen befreit.

2. Fraktionierte Zentrifugation

Eine Fraktionierung des Rohextraktes in eine "lösliche" und eine Partikel-Fraktion erfolgte durch einstündiges Zentrifugieren bei 0° und 100000 x g (Fa.Christ "Omikron", 30000 U/min., Rotor 24 x 10). Das Überstehende bildete die "lösliche" Fraktion, während das Zentrifugat nach dem Waschen mit 0,066 M Phosphatpuffer, pH 7,0 und Resuspendieren in dem gleichen Puffer die Partikelfraktion ergab.

Proteinbestimmung in zellfreien Extrakten (SCHMIDT, LIAAEN-JENSEN u. SCHLEGEL 1963): Reagenslösung: 5 g K,Na-Tartrat, 1 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 2,5 g KJ, 4 g NaPH, Wasser ad 400 ml.
0,05-0,2 ml des betreffenden Extrakts wurden mit dest. Wasser auf 4 ml verdünnt und mit 0,4 ml einer 16 %igen NaOH-Lösung 5 Min. in kochendem Wasser erhitzt. Nach schnellem Abkühlen auf Zimmertemperatur werden 1,6 ml der Reagenslösung zugesetzt, 20 Min. bei 37° inkubiert und die Extinktion bei λ = 546 mμ (d = 2 cm) gegen einen keinen Extrakt enthaltenen Ansatz gemessen. Einer Extinktion von E = 0,1 entsprachen unter diesen Bedingungen

1,18 mg Protein im Ansatz.

C. Reinigung und Bestimmung von Ferredoxin in zellfreien Extrakten

1. Chromatographie an DEAE-Zellulose (MORTENSON, VALENTINE u. CARNAHAN 1962)

DEAE-Zellulose (50 ml) wurden in 2 M Phosphatpuffer, pH 6,5 (500 ml) aufgeschwemmt, nach 12 Stunden auf eine Glasfilternutsche (Ø 9,5 cm, Höhe 7,5 cm) zu einem 4 cm hohen Bett geschichtet und mit 10 Volumina Wasser gewaschen. Die aus den Zellen von Cl.pasteurianum (100 g Naßgewicht) erhaltenen Rohextrakte (40 ml) wurden auf die Säule gegeben und mit 10 Vol. Wasser und 10 Vol. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5 gewaschen. Während die ersten proteinreichen 21 ml das phosphoroklastische Enzymsystem enthielten (Fraktion A), blieb das Ferredoxin als dunkelbrauner Streifen am oberen Rand der Säule adsorbiert und ließ sich erst mit 0,15 M Tris-Puffer, pH 7,3, das 0,67 M NaCl enthielt, eluieren (TAGAWA u. ARNON) (Fraktion B). Diese Fraktion (18 ml) wurde 12 Stunden gegen Wasser dialysiert.

Der Versuch, aus Hydrogenomonas H 16 Ferredoxin zu isolieren, erfolgte in gleicher Weise.

2. Bestimmung der Ferredoxin-Aktivität

Die Ermittlung der Ferredoxin-Aktivität beruht auf der Bestimmung der durch das phosphoroklastische Enzymsystem und Ferredoxin katalysierten Bildung von Acetylphosphat.

a) 0,5 ml Enzymfraktion A	10,05 mg Protein
0,1 ml Natriumpyruvat	110 µmole
0,01 ml Coenzym A	0,13 µmole
0,1 ml 0,5 M Kaliumphosphat, pH 6,5	50 µmole
0,05 ml Fraktion B (Ferredoxin)	0,144 mg Protein
Wasser ad 1,0 ml	

Der Ansatz wurde in kleinen Reagensgläsern 15 Min. bei

30° inkubiert, die Reaktion durch Zusatz von 1 ml 2 M NH_2OH abgestoppt und das gebildete Acetylphosphat wie folgt bestimmt (LIPMANN u. TUTLE 1945):

b) Man gibt zu 1 ml 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,4 und 1 ml neutralisiertem Hydroxylaminhydrochlorid 1 ml des obigen Reaktionsgemisches und fügt nach 10 minutigem Stehen bei Raumtemperatur 1 ml 2n HCl, 1 ml 12 %ige Trichloressigsäure und 1 ml 5 %ige $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$-Lösung zu. Nach 15 weiteren Minuten wird ausgefallenes Protein abfiltriert und die Extinktion der Lösung bei 530 mμ gemessen.

c) Standardlösung: In einem 100 ml Meßkolben werden 1 g Bernsteinsäureanhydrid (10 mM) in 40 ml 2 M Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung (neutralisiert) gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. 1 ml dieser 40-fach verdünnten Lösung entspricht einem Farbäquivalent von 2,0 umolen Acetylphosphat.

D. Bestimmung intrazellulärer ATP-Konzentrationen

Die ATP-Bestimmungen erfolgten nach der Biolumineszenzmethode (STREHLER u. McELROY 1957).

1. Herstellung eines Luciferin-Luciferase-Extraktes

1 g getrocknete Leuchtorgane (Firefly Lanterns, Sigma) wurden bei 4° im Mörser zu einem Pulver zerrieben und mit 10 ml kaltem dest.Wasser extrahiert. Nach Einstellen des pH 7,7 mit n NaOH wurde 10 Min. bei 0° und 4000 U/Min. zentrifugiert und das Sediment in gleicher Weise mit 5 ml Wasser nachextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden eingefroren, nach dem Wiederauftauen von denaturiertem Protein durch Zentrifugation bei 5000 U/Min. (10 Min., 2°) befreit und der pH des Extraktes auf pH 7,5 eingestellt. Dies Rohpräparat ließ sich bei -30° über Wochen ohne Aktivitätsverlust aufbewahren.

2. Extraktion von ATP

Die Extraktion des ATP aus intakten Bakterienzellen erfolgte durch Einwirkung von Perchlorsäure oder durch Erhitzen in siedendem Wasser. 10 ml der Zellsuspension wurde zu 5 ml einer 10 %igen $HClO_4$-Lösung gegeben. Nach 30 minutigem Stehen neutralisierte man vorsichtig mit 10%iger KOH, zentrifugierte das ausgefallene $KClO_4$ und die Zellrückstände nach 2 stündigem Aufbewahren bei 4° ab (5000 U/min) und füllte die Probe auf 20 ml auf. Ein späterer Vergleich zeigte, daß die Extraktion des ATP auch durch die "Heißwasser"-Methode erfolgt. 10 ml der Bakteriensuspension wurden in 20 ml siedendes Wasser gegeben und 10 Min. auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt. Die Proben wurden dann in einem Eisbad bis zur Analyse aufbewahrt.

3. Bestimmung von ATP

Die ATP-Bestimmung erfolgte durch Messung des in Gegenwart des Luciferin-Luciferase-Systems emittierten Lichts mit einem unter Verwendung des Ultra-Kryomaten TK 30 D (Meßgerätewerk Lauda) auf -10° gekühlten Szintillationszähler FHT 660 C und des Strahlungsmeßgeräts FH 90 der Firma Frieseke & Hoepfner.

Reagentien: 0,025 M Glycylglycin -0,1 M $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, pH 7,5
Luciferin-Luciferase-Rohextrakt

Zu einem in einem Probenfläschchen befindlichen Gemisch aus 0,1 ml Luciferin-Luciferase-Extrakt und 2,1 ml Glycylglycin-Mg^{2+}-Puffer gibt man mit Hilfe einer 0,25 ml-Injektionsspritze schnell 0,2 ml des ATP-Extraktes. Nach Mischen des Reaktionsgemisches und Einstellen der Probenflasche in die Zählkammer des Szintillationszählers wird die Lichtemission genau 15 sec. nach Zugabe der ATP-Lösung 1 Minute lang bei einer Eingangsempfindlichkeit des Zählgeräts von 200 mV gemessen. Unter diesen Bedin-

gungen ergaben 0,2 ml einer $5 \cdot 10^{-8}$M ATP-Lösung je nach Aktivität des Enzympräparats 1000 - 2000 I/min. bei einem Untergrund von weniger als 10 I/min. Die ATP-Konzentration der Proben wurde durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe von 1×10^{-7} bis 1×10^{-9} M ATP bestimmt.

E. Bestimmung der intrazellulären Pyridinnucleotid-Konzentrationen

1. Extraktion der Pyridinnucleotide aus intakten Zellen

a) NAD und NADP: Man gab 9 ml der Bakteriensuspension zu 1 ml einer 24 %igen $HClO_4$-Lösung und zentrifugierte nach 15 min. Rühren bei Raumtemperatur die Zellreste ab(5000 U/min., 15 Min. 4°). Das Überstehende wurde unter Rühren mit 2n KOH auf pH 7,4 eingestellt (pH-Meter, Magnetrührer). Nach 2 stündigem Stehen bei 4° zentrifugierte man ausgefallenes $KClO_4$ ab und füllte die Proben auf 20 ml auf.

Da Perchlorationen die Bestimmungsmethode nicht beeinflussen, wurde später mit 2n NaOH neutralisiert, wodurch die 2. Zentrifugation entfiel.

b) $NADH_2$ und $NADPH_2$: -9 ml der Bakteriensuspension wurden zu 1 ml auf 90° erwärmte 0,4 n NaOH-Lösung gegeben und 20 Min. auf 70 - 90° im Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen im Eisbad zentrifugierte man die Zellen ab, stellte das Überstehende mit 1 M KH_2PO_4 auf pH 7,4 ein und füllte die Proben auf 15 ml auf.

2. Bestimmungen der Pyridinnucleotide

Reagentien: Dichlorphenolindophenol-Lösung: Eine 1 Woche haltbare Vorratslösung von 18 mg Dichlorphenolindophenol in 100 ml Wasser 1:10 verdünnt.
Phenazinmethosulfat-Lösung: 1 mg/ml Wasser, täglich neu angesetzt und im Dunkeln aufbewahrt.

Äthanol-Phosphatpuffer: 6,5 ml abs. Alkohol und 85 ml 0,13 M Phosphatpuffer, pH 7,4.
Glucose-6-phosphat-Tris-Puffer: 91,2 mg Glucose-6-phosphat in 42 ml 0,13 M Tris-Puffer, pH 8,0 gelöst.
Alkohol-Dehydrogenase (Boehringer)
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: spez. Altivität: 2,95. Aus Bierhefe 13-fach angereichert.

a) NAD und $NADH_2$:-Ansatz: 1 ml Dichlorphenolindophenol, 0,05 ml Phenazinmethosulfat, 14 ml Äthanol-Phosphatpuffer, 0,5 ml $HClO_4$- bzw. NaOH-Extrakt. Nach 2 Min.: 0,05 ml Alkohol-Dehydrogenase.

b) NADP und $NADPH_2$: - Ansatz: 1ml Dichlorphenolindophenol, 0,05 ml Phenazinmethosulfat, 1,4 ml Glucose-6-phosphat-Tris-Puffer, 0,5 ml $HClO_4$- bzw. NaOH-Extrakt. Nach 2 Min.: 0,15 ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.

Man mißt 15 Min. lang jede Minute die Abnahme der Extinktion bei 590 mμ und vergleicht die Aktivitäten mit denen, die durch 0,5 ml-Zusätze aus einer gleichzeitig mit der Extraktion angesetzten Verdünnungsreihe der betreffenden Pyridinnucleotide erzielt wurden.

3. Anreicherung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (KORNBERG u. HORECKER 1953)
Die für die Bestimmung von $NADP(H_2)$ als Hilfsenzym benötigte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde aus Bierhefe durch Autolyse, Fraktionierung mit Ammoniumsulfat, Adsorption an Calciumphosphatgel und erneute Fraktionierung mit Ammoniumsulfat 13-fach mit einer spez. Aktivität von 2,95 angereichert.

F. Bestimmung der intrazellulären Coenzymkonzentration unter physiologischen Bedingungen.

Bei der Bestimmung des ATP-Gehaltes und des $NADH_2$/NAD-Verhältnisses in Zellen unter verschiedenen physiologi-

schen Bedingungen wurden 25 ml Bakteriensuspensionen in 0,066 M Phosphatpuffer, pH 7,0 (Tr.Gew. $<$ 0,5 mg/ml) in 200 ml-Erlenmeyerkolben bei 30° geschüttelt. Die Begasung mit dem betreffenden Gasgemisch erfolgte durch doppelt durchbohrte Gummistopfen. Proben entnahm man nach bestimmten Inkubationszeiten und arbeitete wie beschrieben auf.

G. Bestimmung des Flavingehalts ganzer Zellen (PEEL 1958)

Man versetzt 50 ml einer Bakteriensuspension (Tr.Gew. 32,3 mg/ml) mit 13 ml einer 50 %igen Trichloressigsäure-Lösung und zentrifugiert nach 5 min. Stehen bei Raumtemperatur 20 Min. bei 4° und 5000 U/min. die Zellreste ab. Alle folgenden Operationen wurden bei 4° und künstlichem Licht durchgeführt. Die Abtrennung der Trichloressigsäure erfolgte durch Adsorption der Flavine an Florisil.

Eine mit einem Kühlmantel ausgestattete Säule (Innerer Ø:18 mm, Länge: 40 cm) wurde mit einer 16 Stunden vorher angesetzter Suspension von 6 g Florisil (60-100 mesh) in 400 ml 0,1 n HCl gefüllt und mit Wasser bis zu einem pH zwischen 6 und 7 gewaschen. 50 ml des durch Zentrifugation erhaltenen Extrakts (einem Äquivalent von 1282 mg Zellen entsprechend) wurden auf die mit einem Ultra Kryomat TK 30 D auf 2° gekühlte Säule gegeben und mit größtmöglicher Durchflußgeschwindigkeit eluiert. Nach Auftragen von 10 ml 2 %iger Essigsäure wusch man die am oberen Teil der Säule adsorbierten Flavine (Fluoreszenz im UV-Licht) mit je 100 ml 2 %iger Essigsäure, Wasser und 0,5 %iger Pyridinlösung und eluierte mit 8 ml 25 %igem Pyridin. Das Pyridin wurde aus dem Eluat durch 3-malige Extraktion mit je 100 ml Chloroform, das Chloroform durch Extraktion mit 100 ml Äther und der Äther mit Luft, das durch das Eluat geleitet wurde, entfernt. Nach Neutralisation mit 1 Tropfen 0,04 n NaOH füllte man mit Wasser auf 10 ml auf und bestimmte die Extinktion bei 450 mμ in

1 cm-Küvetten gegen Wasser.
Zur Bestimmung der prozentualen Ausbeute der Methode wurden Lösungen von 200 mμmole FAD und 200 mμmole FMN den beschriebenen Isolierungsbedingungen unterworfen. Die Berechnung mit den molaren Extinktionskoeffizienten von $11{,}3 \cdot 10^3$ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ für FAD und $12{,}2 \cdot 10^3$ $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ für FMN ergab, daß 73 % des FAD und 79 % des FMN erfaßt werden. Die Berechnung des Gesamtflavins erfolgte mit einem mittleren molaren Extinktionskoeffizienten von $11{,}8 \cdot 10^3$ $l\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ unter Berücksichtigung einer 76 %igen Ausbeute.
Eine elektrophoretische Trennung der Flavine wurde unter Verwendung der Elektrophoreseapparatur Type LKB 3276 in 0,025 M Ameisensäure/Ammoniumformiat, pH 6,4 auf Papierstreifen (4 x 41 cm, Schleicher & Schüll 2034 b) bei 300 V und 1,6 mA durchgeführt.

H. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität ist definiert als μmole Substratumsatz/min./mg Protein.

1. Hydrogenase (EC 1.98.1.1.)

a) Optische Bestimmung[+)] der NAD-Reduktion (Thunberg-Küvette)
Hauptraum: Tris-Puffer, pH 7,8 (200 μmole), Extrakt, Wasser ad 2,7 ml.
Seitenarm: NAD (0,6 μmole) 0,3 ml.
Die Thunberg-Küvette wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe evakuiert (2 min.), durch ein an die Gasbombe

[+)] Die optischen Bestimmungen wurden mit dem Spektralphotometer Elko III der Firma C.Zeiss bei Raumtemperatur durchgeführt.

angeschlossenes Y-Stück mit Wasserstoff gespült und die Reaktion durch Zugabe der NAD-Lösung aus dem Seitenarm gestartet. Wegen der Höhe der Thunberg-Küvetten mußte der Meßraum des Photometers mit einem schwarzgestrichenen Gehäuse aus Trovidur abgedeckt werden.

b) Manometrische Bestimmung[+)] mit Methylenblau als H-Akzeptor
Hauptraum: Phosphatpuffer, pH 7,5 (120 µmole), Extrakt.
Seitenarm: Methylenblau (20 µmole).
Gesamtvolumen: 2,0 ml.

c) Manometrische Bestimmung mit NAD als H-Akzeptor
Hauptraum: Phosphatpuffer, pH 7,5 (120 µmole), Extrakt.
Seitenarm: NAD (10 µmole).
Gesamtvolumen: 2,0 ml.

d) Manometrische Bestimmung mit NAD als H-Akzeptor und Kopplung mit Pyruvat-LDH
Hauptraum: Phosphatpuffer, pH 7,5 (120 µmole), Extrakt, Natriumpyruvat (20 µmole).
Seitenarm: NAD (3 µmole), LDH (1000 Einheiten).
Gesamtvolumen: 2,2 ml.

e) Manometrische Bestimmung mit NAD als H-Akzeptor und Kopplung mit Phenazinmethosulfat
Hauptraum: Phosphatpuffer, pH 7,5 (120 µmole), Extrakt.
Seitenarm: NAD (3 µmole), Phenazinmethosulfat (30 µmole).
Gesamtvolumen: 2,2 ml.
Die Reaktionen wurden nach 10 Min. Begasen mit Wasserstoff und erfolgtem Temperaturausgleich durch Zugabe der Substrate aus den Seitenarmen gestartet.

[+)] Alle manometrischen Messungen erfolgten mit einem Rund-Warburg der Firma Braun, Melsungen. Schüttelfrequenz: 140/min. Amplitude: 4 cm. Temperatur: 30°.

f) Manometrische Bestimmung mit O_2 als H-Akzeptor (Knallgasreakt.)
Hauptraum: Phosphatpuffer, pH 7,5 (120 µmole), Extrakt.
Zentralgefäß: 20 %ige KOH (0,2 ml).
Gesamtvolumen: 2,0 ml.
Die Gefäße wurden mit einem aus 75 % H_2 und 25 % Luft bestehendem Gasgemisch begast und die Messung nach Temperaturausgleich begonnen.

2. Optische Bestimmung der NAD(P)H_2-Oxydase: Ansatz- 1,7 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,5 ml NAD(P)H_2 (1 µmol), Extrakt, Wasser ad 3,0 ml. $\Delta E_{365\ m\mu}$.

3. Optische Bestimmung der Diaphorase (EC 1.6.4.3.): Ansatz- 2,0 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,1 ml 0,001 M KCN, 0,1 ml $NADH_2$ (0,2 µmole), Extrakt, 0,1 ml Dichlorphenolindophenol (0,02 µmole) $\Delta E_{590\ m\mu}$.

4. Optische Bestimmung der $NADH_2$: Cytochrom c-Oxidoreductase (EC 1.6.2.1.)- Ansatz: 1,7 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,2 ml NaN_3 (7 µmole), 0,2 ml Cytochrom c (1,4 mg) (durch 5 min. Durchleiten von Luft oxydiert), Extrakt, Wasser ad 3,0 ml $\Delta E_{550\ m\mu}$.

5a. Optische Bestimmung der Succinat: Akzeptor-Oxidoreductase (EC 1.3.99.1.)- Ansatz: 1,7 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0, 0,1 ml KCN (0,001 M), 1 ml Na-succinat (2 µmole), 0,1 ml Dichlorphenolindophenol (0,02 µmole), Extrakt, Wasser ad 3,0 ml $\Delta E_{590\ m\mu}$.

5b. Manometrische Bestimmung der Succinat: Akzeptor-Oxidoreductase (EC 1.3.99.1.)- Ansatz: 0,8 ml 0,15 M Phosphatpuffer, pH 7.5, 0,1 ml Na-Succinat (30 µmole), Extrakt. Seitenarm: 0,4 ml Phenazinmethosulfat (30 µmole). Gesamtvolumen: 2,0 ml.

6. Optische Bestimmung der $NADH_2$: 2-Methyl-1,4-naphthochinon-Oxidoreductase (EC 1.6.5.2.)- Ansatz: 2,0 ml 0,1 M Tris-Puffer, pH 7.8, 0,05 ml Menadion (1 µmol),

0,3 ml $NADH_2$ (0,6 µmole), Extrakt, Wasser ad 3,0 ml $\Delta E_{365\ m\mu}$.

7. Cytochrom c:O_2-Oxidoreductase (EC 1.9.3.1.)

a) Aktivitätsbestimmung: Der aus 0,2 ml 1/40 M Phosphatpuffer, pH 7.8, 0,25 ml 0,1 %igem α-Naphthol in 22 %igem Alkohol, 0,35 ml 0,1 %igem Dimethyl-p-phenylendiamin-hydrochlorid, 0,15 ml 0,02 % Cytochrom c und 0,45 ml Wasser bestehende Ansatz wird in einem kleinen Reagensglas (10 x 1 cm) 2 Min. in einem Wasserbad auf 37° erwärmt. Nach Zugabe von 0,1 ml Extrakt wird gut gemischt und genau 5 Minuten bei 37° inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch Zugabe eines Chloroform-Alkohol-Gemisches (9:1), kräftigem Schütteln und Abkühlen im Eisbad. Das Reaktionsgemisch wird in einen 150 ml-Schütteltrichter überführt, das Reagensglas mit kleinen Mengen Chloroform-Alkohol nachgespült und das gebildete Indophenolblau nach Zugabe von 75 ml Wasser 2 mal mit je 10 ml Chloroform-Alkohol extrahiert. In den Extrakt gelangtes denaturiertes Protein wird durch Filtration entfernt, der Extrakt in einem graduierten Standzylinder auf 25 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 546 mµ gegen einen Extrakt aus einem gleichbehandelten Ansatz ohne Proteinzusatz gemessen.

b) Bestimmung einer Indophenolblau-Einheit: Eine Indophenolblau- (IPB) Einheit ist definiert als die in 10 ml Chloroform gelöste Menge Indophenolblau, die bei der Oxydation von 0,1 mg α-Naphthol und einer äquimolaren Menge Dimethyl-p-phenylendiamin-hydrochlorid mit $K_2Cr_2O_7$ entsteht. Ansatz: 0,2 ml 1/40 M Phosphatpuffer, pH 7.8, 0,1 ml 0,1 % α-Naphthol, 0,14 ml 0,2 % Dimethyl-p-phenylendiamin-hydrochlorid, 0,06 ml Wasser und 1 ml 0,2 % $K_2Cr_2O_7$-Lösung wurden

5 Min. bei 37° inkubiert und mit 10 ml Chloroform extrahiert. $E_{546\ mu}$ 0,136.

8. Optische Bestimmung der ATP:AMP-Phosphotransferase (EC 2.7.4.3.)-Ansatz: 2,15 ml 0,05 M TEA-Puffer, pH 7.6., 0,2 ml AMP (10 mg/ml), 0,2 ml ATP (10 mg/ml), 0,15 ml 0,5 M $MgSO_4$ in 2 M KCl, 0,1 ml PEP-Cyclohexylammoniumsalz (5 mg/ml), 0,1 ml $NADH_2$ (10 mg/ml), 0,02 ml Pyruvatkinase (5 mg/ml), 0,02 ml LDH (5 mg/ml), Extrakt, Wasser ad 3 ml. $E_{365\ mu}$.

9. Optische Bestimmung der L-Malat:NAD-Oxidoreductase (EC 1.1.1.37.)-Ansatz: 0,75 ml 0,1 M Tris-Puffer, pH 7.4, 0,05 ml $NADH_2$(10 mg/ml), 0,1 ml 0,1 M Na-oxalacetat, pH 7,0, Extrakt, Wasser ad 2,0 ml. $E_{365\ mu}$.

10. Optische Bestimmung der L-Lactat:NAD-Oxidoreductase (EC 1.1.1.27.)-Ansatz: 2,73 ml 0,05 M TEA-Puffer, pH 7.6, 0,05 ml $NADH_2$ (10 mg/ml), 0,2 ml Na-pyruvat (4 mg/ml), Extrakt, Wasser ad 3,0 ml. $E_{365\ mu}$.

11. Optische Bestimmung der D-3-Hydroxybutyrat:NAD-Oxidoreductase (EC 1.1.1.30.)-Ansatz: 2,0 ml 0,1 M Tris-Puffer, pH 7.8, Extrakt, 0,3 ml NAD (0,6 umole). $E_{365\ mu}$.

Verwendete Abkürzungen:

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTS	Brenztraubensäure
CoA	Coenzym A
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
Glu-6-P	Glucose-6-phosphat
Glu-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HS-CoA	Coenzym A
LDH	Lactat-Dehydrogenase
mE	Millieinheiten
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
P_a	anorganisches Phosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHBS	Poly-ß-hydroxybuttersäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

ZUSAMMENFASSUNG

1. Zellfreie Extrakte aus Hydrogenomonas H 16 werden durch hochtourige Zentrifugation in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion getrennt, jede von beiden katalysiert die Oxydation von Wasserstoff. Während die Knallgasreaktion in der löslichen Fraktion über eine mit NAD verbundene Hydrogenase und ein Oxydase-System erfolgt, an dem keine Cytochrome beteiligt sind, verläuft der Elektronentransport bei der durch die Partikeln katalysierten Wasserstoff-Oxydation über eine vollständige Atmungskette, die aus einer partikulären Hydrogenase, Flavoproteinen, Cytochrom b und c sowie einer Cytochromoxydase besteht. Eine Verbindung mit Ferredoxin-Aktivität konnte in den Extrakten nicht nachgewiesen werden.
2. Außer Wasserstoff wird von den Partikeln nur Succinat oxydiert. Beide Fraktionen besitzen jedoch relativ hohe Menadionreductase-Aktivitäten, die eine Möglichkeit zur Übertragung von Reduktionsäquivalenten aus dem Cytoplasma auf die in den Partikeln lokalisierten Atmungsketten bieten.
3. Ruhende Zellen von Hydrogenomonas H 16 enthalten pro g Trockengewicht 150 mµmole Flavine, 0,7 mg ATP, 0,9 mg NAD und 0,09 mg NADP. Bei der mit der Fixierung von CO_2 und der Synthese des Speicherstoffs PHBS verbundenen starken Beschleunigung der Knallgasreaktion sinkt die intrazelluläre ATP-Konzentration um 30 % und verändert sich das Redoxverhältnis NADH/NAD von 1,4 auf 0,46.
4. Die lösliche Hydrogenase reduziert NAD und Methylenblau. Ihre Aktivität wird durch Fe^{2+}, FMN und FAD stimuliert. Dagegen reagiert die partikuläre Hydrogenase nur mit künstlichem Elektronenakzeptoren wie Methylenblau und Dichlorphenolindophenol. Ihre Aktivität wird durch

physiologische Verbindungen mit Ausnahme von Menadion ebenso wenig beeinflußt wie die Knallgasreaktion in den Partikeln.

5. Durch Inkubation bei pH 11 und durch Dialyse gegen einen Dimercaptopropanol enthaltenden Puffer konnte die Hydrogenase-Aktivität teilweise von den Partikeln abgelöst werden. Das Enzym ist im gelösten Zustand instabil, rekombiniert mit den verbleibenden Partikeln nicht und reduziert kein NAD. Die Frage nach dem physiologischen Akzeptor der partikelgebundenen Hydrogenase bleibt daher offen.
6. Das Hydrogenase-System von Hydrogenomonas H 16 ähnelt in seiner Verteilung, seinen Eigenschaften und im kinetischen Verhalten der löslichen Hydrogenase dem von Hydrogenomonas ruhlandii. Dagegen sind in der löslichen und partikulären Fraktion aus Hydrogenomonas facilis nur mit Methylenblau Hydrogenase-Aktivitäten nachzuweisen. NAD wird nicht reduziert.
7. Kinetische Untersuchungen ergaben, daß die lösliche Hydrogenase von Hydrogenomonas H 16 NAD als Coenzym fest gebunden enthält. In Gegenwart von Wasserstoff wird dieses zu NADH reduziert und das Enzym in eine aktive, reaktionsfähige Form umgewandelt. Die Geschwindigkeit der durch die lösliche Hydrogenase katalysierten NAD-Reduktion ist von der Konzentration des Coenzyms und infolge einer allosterischen Hemmung durch NADH vom Redoxverhältnis des Nicotinamid-adenindinucleotids abhängig. Hierdurch erhält das Enzym eine regulatorische Funktion für die CO_2-Fixierung.

LITERATURVERZEICHNIS

ARNON, D.I.
WHATLEY, F.R.
ALLEN, M.B.
1957 Triphospyridine nucleotide as a catalyst of photosynthetic phosphorylation.
Nature (Lond.) 180, 182-185

ASANO, A.
BRODIE, A.F.
1965 Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. XVIII. Phosphorylation coupled to different segments of the respiratory chaine of Mycobacterium phlei.
J. Biol. Chem. 240, 4002-4010

ASPEN, A.J.
WOLIN, M.J.
1965 Solubilization and reconstitution of a particulate hydrogenase from Vibrio succinogenes.
65th. Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol. P 141

ATKINSON, D.E.
1965 Biological feedback control at the molecular level.
Science 150, 851-857

ATKINSON, D.E.
McFadden, B.
1954 The biochemistry of Hydrogenomonas. I. The hydrogenase of Hydrogenomonas facilis in cell-free preparations.
J. Biol. Chem. 210, 885-893

BARTHA, R.
1962 Physiologische Untersuchungen über den chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter Hydrogenomonas-Stämme.
Arch. Mikrobiol. 41, 313-350

BERNSTEIN, S.
VISHNIAK, W.
1959 Purification and properties of a DPN-linked hydrogenase.
Fed. Proc. 18, 192

BLOMSTROM, D.C.
KNIGHT Jr., E.
PHILLIPS, W.D.
WEIHER, J.F.
1964 The nature of iron in ferredoxin.
Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 1085-1092

BONE, D.H. 1960 Localization of hydrogen activating enzymes in Pseudomonas saccharophila. Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 211-214

BONE, D.H. 1963a Cytochromes of Pseudomonas saccharophila. Nature (Lond.) 197, 517

BONE, D.H. 1963b Inhibitor, isotopic and kinetic studies on hydrogen dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 67, 589-598

BOSE, S.K. GEST, H. 1963 Bacterial phosphorylation: Regulation by redox balance. Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 337-345

BRAGG, P.D. 1965 Quinone-independent reduction of cytochrome b_1 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide in a purified soluble system from Escherichia coli. J. Bact. 90, 1498-1499

BRODIE, A.F. 1961 Vitamin K and other quinones as coenzymes in oxidative phosphorylation an bacterial systems. Fed. Proc. 20, 995-1004

BRODIE, A.F. ADELSON, J. 1965 Respiratory chains and sites of coupled phosphorylation. Science 149, 265-269

BRODIE, A.F. RUSSEL, P.J. 1963 Intermediates enzymatically formed during reduction of Vitamin K_1 and their possible role in oxidative phosphorylation. Proceedings of the Fith International Congress of Biochemistry. Vol. V, 89-100 Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris

BUCHANAN, B.B. LOVENBERG, W. RABINOWITZ, J.C. 1963 A comparison of clostridial ferredoxin. Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 345-353

BURNS, R.C.
BULEN, W.A. 1965 ATP-dependent hydrogen evolution by cell-free preparations of Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta 105, 437-445

CARNAHAN, J.E.
CASTLE, J.E. 1958 Some requirements of biological nitrogen fixation. J. Bact. 75, 121-124

COLOWICK, S.P.
KAPLAN, N.O.
NEUFELD, E.F.
CIOTTI, M.M. 1952 Pyridine nucleotide transhydrogenase. I. Indirect evidence for the reaction and purification of the enzyme. J. Biol. Chem. 195, 95

COOK, T.M.
UMBREIT, W.W. 1963 The occurence of cytochrome and coenzyme Q in Thiobacillus thiooxydans. Biochemistry 2, 194

CREMONA, T.
KEARNEY, E.B.
VILLAVICENCIO, M.
SINGER, T.P. 1963 Studies on the respiratory chain-linked DPNH-dehydrogenase. V. Transformation of DPNH-dehydrogenase to DPNH-cytochrome reductase and diaphorase under the influence of heat, proteolytic enzymes, and urea. Biochem. Z. 338, 407-442

DEEP, S.S.
HAGER, L.P. 1964 Cristalline cytochrome b_1 from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 239, 1024-1031

DORNEY, R.J. 1964 Vitamin K-mediated electron transfer in Bacillus subtilis. J. Bact. 88, 904-911

EBERHARDT, U. 1965 Über das Wasserstoff aktivierende System von Hydrogenomonas H 16. Diss. Göttingen

EBERHARDT, U. 1966 Über das Wasserstoff aktivierende System von Hydrogenomonas H 16. I. Verteilung der Hydrogenase-Aktivität auf zwei Zellfraktionen. Arch. Mikrobiol. 53, 288-302

FREDRICKS, W.W.
STADTMANN, E.R. 1965 The role of ferrdoxin in the hydrogenase system from Clostridium kluyveri. J. Biol. Chem. 240, 4065-4071

GREEN, D.E. 1963 The role of lipids in mitochondrial
FLEISCHER, S. electron transfer and oxidative
phosphorylation.
Biochim. Biophys. Acta 70, 554-582

GOEBEL, H. 1964 DPN-spezifische Isocitrat-Dehydro-
KLINGENBERG, M. genase der Mitochondrien. I. Kine-
tische Eigenschaften, Vorkommen und
Funktion der DPN-spezifischen Iso-
citrat-Dehydrogenase.
Biochem. Z. 340, 441-464

GOTTSCHALK, G. 1963 Die Biosynthese der Poly-ß-hydroxy-
buttersäure durch Knallgasbakterien.
Diss. Göttingen

GOTTSCHALK, G. 1964 Die Biosynthese der Poly-ß-hydroxy-
buttersäure durch Knallgasbakterien.
II. Verwertung organischer Säuren.
Arch. Mikrobiol. 47, 230-235

GOTTSCHALK, G. 1964 Verwertung von Fructose durch Hydro-
EBERHARDT, U. genomonas H 16 (I).
SCHLEGEL, H.G. Arch. Mikrobiol. 48, 95-108

HATHAWAY, J.A. 1963 The effect of adenylic acid on
ATKINSON, D.E. yeast nicotinamide adenine dinucleo-
tide isocitrate dehydrogenase, a
possible metabolic control mechanism.
J. Biol. Chem. 238, 2875-2881

HATHAWAY, J.A. 1965 Kinetics of regulatory enzymes:
ATKINSON, D.E. Effect of adenosine triphosphate
on yeast citrat synthase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 20,
661-665

HOLZER, H. 1959 Chemie und Energetik der pflanzli-
chen Photosynthese.
Ang. Chem. 66, 65-75

HOLZER, H. 1958 Regulation of carbohydrate meta-
bolism in yeast cells.
in: recent studies in yeast and
their significance in industry.
Soc. Chem. Ind. 3, 55-67

HÜBENER, H.J. 1959 Über die Extraktion von Mikroorganis-
men durch Ultraschall mit einer
neuen Apparatur.
Biochem. Z. 331, 410- 421

HUGHES, D.E.	1951	A press for disrupting bacteria and other microorganisms. Brit. J. Exptl. Pathol. 32, 97-109
IMSANDE, J. PRESTIDGE, L.S.	1964	A cross-linked control system. II. Control of pyridine nucleotide formation in vivo. Biochim. Biophys. Acta 85, 265-273
JOHNSON, E.M. PECK, Jr., H.D.	1965	Coupling of phosphorylation and carbon dioxide fixation in extracts of Thiobacillus thioparus. J. Bact. 89, 1041-1050
JONES, C.W. REDFEARN, E.R.	1966	Electron transport in Azotobacter vinelandii. Biochim. Biophys. Acta 113, 467-481
KANDLER, O. HABERER-LIESENKÖTTER, J.	1963	Über den Zusammenhang zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. V. Regulation der Glykolyse durch die Lichtphosphorylierung bei Chlorella. Z. f. Naturf. 18b, 718-730
KAPLAN, N.O.	1963	Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. Bact. Rev. 27, 155
KARLSON, P.	1966	Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 250
KASHKET, E.R. BRODLIE, A.F.	1962	Effects of near-ultraviolet irradiation on growth and oxidative metabolism of bacteria. J. Bact. 83, 1094-1100
KASHKET, E.R. BRODIE, A.F.	1963	Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial systems. X. Different roles fpr the natural quinones of Escherichia coli W in oxidative metabolism. J. Biol. Chem. 238, 2564-2570
KIMURA, T. HOUBER, J. SINGER, T.P.	1963	Alcali-inactivation of the succinoxidase system and its reactivation ("reconstitution"). Nature (Lond.) 198, 362-366

KNIGHT, Jr., E. 1966 Flavodoxin: A flavoprotein with
D'EUSTACHIO, D.J. ferredoxin activity from
HARDY, R.W.F. Clostridium pasteurianum.
Biochim. Biophys. Acta 113,
626-628

KORNBERG, A. 1955 Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HORECKER, B.L. in: Colowick-Kaplan: Methods in
Enzymology, Vol. I, 3232

LA RIVIERE, J.W.M. 1958 On the microbial metabolism of the
tartaric acid isomers.
Diss. Delft

LESTER, R.J. 1959 The natural occurence of Coenzyme Q
CRANE, F.L. and related compounds.
J. Biol. Chem. 234, 2169-2175

LIPMANN, F. 1945 A specific microdetermination of
TUTLE, L.C. acyl phosphates.
J. Biol. Chem. 159, 21

MARR, A.G. 1960 Enzyme localization in bacteria.
Ann. Rev. Microbiol. 14, 241-260

McFADDEN, B.A. 1965 Ribulose diphosphate carboxylase
CHANG-CHU L. TU and CO_2 incorporation in extracts
of Hydrogenomonas facilis.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 19,
728-733

McILWAIN, H. 1948 Preparation of cell-free bacterial
extracts with powdered alumina.
J. gen. Microbiol. 2, 288-291

MIZUSHIMA, S. 1963 Quantitative studies on glycolytic
MACHIDA, J. enzymes in Lactobacillus plantarum.
KITAHARA, K. I. Concentration of inorganic ions
and coenzyms in fermenting cells.
J. Bact. 86, 1295-1300

MONOD, J. 1961 General conclusions: Teleonomic
JAKOB, F. mechanisms in cellular metabolism,
growth and differentiation.
Cold Spring Harbor Symp. Quant.
Biol. 26, 389-401

MORTENSEN, L.E. 1963 Nitrogen fixation: Role of ferre-
doxin in anaerobic metabolism.
Ann. Rev. Microbiol. 17, 115-138

MORTENSEN, L.E.
VALENTINE, R.C.
CARHAHAN, J.E.
1962
An electron transport factor from Clostridium pasteurianum.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 448-452

MORTENSEN, L.E.
VALENTINE, R.C.
CARHAHAN, J.E.
1963
Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in Clostridium pasteurianum.
J. Biol. Chem. 238, 794-800

PACKER, L.
1958
Respiratory carriers involved in the oxidation of hydrogen and lactate in facultative autotroph.
Arch. Biochem. Biophys. 78, 54-65

PACKER, L.
VISHNIAK, W.
1955a
Chemosynthetic fixation of carbon dioxide and characteristics of hydrogenase in resting cell suspension of Hydrogenomonas ruhlandii nov. spec.
J. Bact. 70, 216-223

PACKER, L.
VISHNIAK, W.
1955b
Studies on the mechanism of the enzymatic reduction of diphosphopyridine nucleotide by H_2 with purified hydrogenase from Hydrogenomonas ruhlandii.
Bact. Proc. 116

PECK, Jr., H.D.
DAVIDSON, J.T.
1966
Effect of AMP on adenosine-5'-phosphosulfate reductase from Desulfovibrio desulfuricans.
Bact. Proc. 66, 79

PEEL, J.L.
1958
The separation of flavins by paper electrophoresis and its application to the examination of the flavin content of micro-organisms.
Biochem. J. 69, 403,416

RAMAIAH, A.
HATHAWAY, J.A.
ATKINSON, D.E.
1964
Adenylate as a metabolic factor. Effect on yeast phosphofructokinase kinetics.
J. Biol. Chem. 239, 3619-3622

REBEL, G.
MANDEL, P.
1965
Recherches sur les lipides des formes L dérivées du Proteus P 18. II. Isolement de Vitamin K et de coenzyme Q des lipides neutres du Bacille proteus et de ses formes L.
Biochim. Biophys. Acta 98, 380-393

REPASKE, R. 1962 The electron transport system of Hydrogenomonas eutropha. I. Diphosphoyridine nucleotide reduction by hydrogen.
J. Biol. Chem. 237, 1351-1355

REPASKE, R.
LIZOTTE, C.L. 1965 The electron transport of Hydrogenomonas eutropha. II. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide menadione reductase.
J. Biol. Chem. 240, 4774-4779

ROSEN, O.M. 1965 Purification and properties of a specific fructose-1,6-diphosphatase from Candida utilis.
Arch. Biochem. Biophys. 112, 411-420

SAN PIETRO, A.
LANG, H.M. 1956 Accumulation of reduced pyridine nucleotide by illuminated grana.
Science 124, 118-119

SANTARIUS, K.A.
HEBER, U. 1965 Changes in the intracellular levels of ATP, ADP, and P_i and regulatory function of the adenylate system in leaf cells during photosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 102, 39-54

SCHATZ, A.
BOVELL, C. 1952 Growth and hydrogenase of a new bacterium, Hydrogenomonas facilis.
J. Bact. 63, 87-98

SCHINDLER, J. 1964 Die Synthese von Poly-ß-hydroxybuttersäure durch Hydrogenomonas H 16: die zu ß-Hydroxybutyryl-Coenzym A führenden Reaktionsschritte.

SCHLEGEL, H.G.
GOTTSCHALK, G.
BARTHA, R.v. 1961 Formation and utilization of poly-ß-hydroxybutyric acid by Knallgasbacteria (Hydrogenomonas).
Nature (Lond.) 191, 463-465

SCHLEGEL, H.G.
KALTWASSER, H.
GOTTSCHALK, G. 1961 Ein submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen.
Arch. Mikrobiol. 38, 209-222

SCHMIDT, K.
LIAAEN-JENSEN, S.
SCHLEGEL, H.G. 1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch. Mikrobiol. 46, 117

SCHOLES, D.P.
KING, H.K. 1965 Electron transport in a Park-Williams strain of Corynebacterium diphtheriae.

SLATER, T.F.
SAWYER, B. 1962 A colorimetric method for estimating the pyridine nucleotide content of small amounts of animal tissue. Nature (Lond.) 193, 454-456

SMITH, L. 1961 Cytochrome systems in aerobic electron transport. in: I.C. Gunsalus u. R.J. Stanier (Ed.): The Bacteria, Vol. 2,365

STANGE, R.E.
WADE, H.E.
DARK, F.A. 1963 Effect of starvation on adenosine triphosphate concentration in Aerobacter aerogenes. Nature (Lond.) 199, 55-57

STRAUS, W. 1954 Colorimetric microdetermination of cytochrome c oxidase. J. Biol. Chem. 207, 733-743

STREHLER, B.L.
McELROY, W.D. 1957 Assay of adenosine triphosphate. in: S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Eds.): Methods in Enzymology, Vol. III, 871, Acad. Press, New York

TAGAWA, K.
ARNON, D.I. 1962 Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas. Nature (Lond.) 195, 537-543

TAGAWA, K.
TSUJIMOTO
ARNON, D.I. 1963 Role of chloroplast ferredoxin in the energy process in photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 567

TAKEBE, I.
KITAHARA, K. 1963 Levels of nicotinamide nucleotide coenzymes in lactic acid bacteria. J. gen. appl. Microbiol. 9, 31-40

TANIGUCHI, S.
KAMEN, M.D. 1965 The oxidase system of heterotrophically-grown Rhodospirillum rubrum. Biochim. Biophys. Acta 96, 395-428

UMBARGER, H.E.	1956	Evidence for a negative-feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine. Science 123, 848
Van DEMARK, P.J. SMITH, P.F.	1964	Respiratory pathways in the Mycoplasma. II. Pathway of electron transport during oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by Mycoplasma hominis. J. Bact. 88, 122-129
VALENTINE, R.C. JACKSON, R.L. WOLFE, R.S.	1962	Role of ferredoxin in hydrogen metabolism of Micrococcus lactilyticus. Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 453-456
VALENTINE, R.C. WOLFE, R.S.	1963	Role of ferredoxin in the metabolism of molecular hydrogen. J. Bact. 85, 1114-1120
VISHNIAK, W. TRUDINGER, P.A.	1962	Symposium on autotrophy: V. Carbon dioxide fixation and substrate oxidation in chemosynthetic sulfur and hydrogen bacteria. Bact. Rev. 26, 168-175
WALTON, G.M. ATKINSON, D.E.	1966	Properties of Escherichia coli phosphofructokinase. Bact. Proc. 66, 79
WEIBULL, D.	1953	Observations on the staining of Bacillus megaterium with triphenyltetrazolium. J. Bact. 66, 137-139
WHITE, A. HANDLER, P. SMITH, E.L.	1964	Oxidative phosphorylation. Principles of Biochemistry, Third Ed., 332 McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, London.
WILDE, E.	1961	Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas. Diss. Göttingen
WILDE, E.	1962	Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas. Arch. Mikrobiol. 43, 109-137

WISE, J.B.
LEHNINGER, A.L. 1962 The stability of mitochondrial D-ß-hydroxybutyric-dehydrogenase and its relationship to the respiratory chain.
J. Biol. Chem. 237, 1363

YATES, R.A.
PARDEE, A.B. 1956 Control of pyrimidine biosynthesis in Escherichia coli by a feedback mechanism.
J. Biol. Chem. 221, 757-770

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. H.G. Schlegel für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse und für die mir stets gewährte Unterstützung danken.

Lebenslauf

Am 30.5.1931 wurde ich, Jürgen Ahrens, als einziger Sohn des Malers Willy Ahrens und seiner Ehefrau Martha, geb. Thielk in Wismar (Mecklenburg) geboren. Nach Beendigung der Grundschule besuchte ich von 1942 bis 1949 die Oberrealschule in Wismar, zuletzt als Schüler der 11. Klasse. Von 1949 bis 1955 war ich wegen "antisowjetischer Haltung" im Gewahrsam der sowjetischen Besatzungsmacht. 1956 nahm ich in Göttingen an einem Sonderlehrgang teil, der im März 1957 mit der Reifeprüfung abschloß. Im gleichen Jahr begann ich mit dem Studium der Chemie an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im Wintersemster 1960/61 bestand ich das Diplomvorexamen in Chemie und nach Anfertigung einer Diplomarbeit "Über die Konstitution des gelben Mutterkornfarbstoffs Ergoflavin" im organisch-chemischen Institut der Universität Göttingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. B.Franck im Herbst 1962 die Diplomhauptprüfung für Chemiker. Seit dem Wintersemester 1962/63 arbeite ich im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen an der vorliegenden Dissertation.

Meinen akademischen Lehrern bin ich zu großem Dank verpflichtet. Es sind dies die Herren Professoren und Dozenten BROCKMANN, DEUTICKE, DOMAGK, FLAMMERSFELD, FRANCK, GLEMSER, HILSCH, JANNASCH, JOST, MEYER, PFENNIG, SCHÄFER, SCHLEGEL, SCHNEIDER, THIELE, TREBST und ZEMANN.